# Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава России

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России

На правах рукописи

# ЦЫГАНКОВ АЛЕКСАНДР ЮРЬЕВИЧ

# ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ДИАГНОСТИКИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ И ИХ КОРРЕЛЯЦИЯ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ПРИ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЕ

Специальность 14.01.07. - «Глазные болезни»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель Доктор медицинских наук, профессор Саакян С.В.

Москва - 2014

# Оглавление

Список сокращений	4
Введение	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	
1.1. Характеристика увеальной меланомы	13
1.2. Молекулярно-генетические изменения, выявляе	мые в увеальных
меланомах	24
1.3. Ассоциация клинико-патологических факторов	с молекулярно-
генетическими нарушениями при УМ	38
ГЛАВА 2. Материалы и методы	
2.1. Клинико-инструментальные методы исследования	я44
2.2. Методика молекулярно-генетического и ци	итогенетического
исследования УМ	47
2.3. Диспансеризация больных с увеальной меланомой	ĭ59
2.4. Статистическая обработка результатов исследован	ния59
ГЛАВА 3. Результаты собственных исслед	ований и их
обсуждение. Ретроспективная группа	
3.1. Ассоциация клинико-морфологических	особенностей с
молекулярно-генетическими изменениями в кле	тках увеальной
меланомы	61
3.2. Зависимость выживаемости от молекуляр	но-генетических
изменений	70
3.3. Клинические, патоморфологические и	и молекулярно-
генетические особенности УМ с выс	оким риском
метастазирования	76

ГЛАВА 4. Результаты собственных исследований и их
обсуждение. Проспективная группа
4.1. Общая клинико-морфологическая характеристика группы84
4.2. Ассоциация клинико-морфологических характеристик со
статусом хромосом 3, 1 и 8
4.3. Взаимосвязь клинико-морфологических характеристик УМ с
метилированием генов <i>RASSF1A</i> и <i>SEMA3B</i>
4.4. Влияние мутаций в онкогенах GNAQ/GNA11 на клинические
и морфологические характеристики УМ
4.5. Ассоциация мутаций в гене ABCB1/MDR1 с риском развития
УМ101
Заключение
Выводы
Практические рекомендации
Список использованной литературы118

## Список сокращений

УМ – увеальная меланома

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

FISH – флуоресцентная гибридизация in situ

M-FISH – мультиплекс- флуоресцентная гибридизация in situ

SKY – спектральное кариотипирование

CGH – сравнительная геномная гибридизация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

МАРК – митоген-активируемый протеин-киназный путь

GNAQ – гуаниновый нуклеотид-связывающий протеин

ОКТ – оптическая когерентная томография

ТИАБ – тонкоигольная аспирационная биопсия

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

LOH – потеря гетерозиготности (ПГ)

ЦТ – цилиарное тело

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

Arg – аргинин

Gln – глутамин

#### Введение

# Актуальность темы и степень ее разработки

«Частота меланомы органа зрения достигает 5% от количества меланом других локализаций, а увеальной меланомы (УМ) составляет до 85-88% всех первичных внутриглазных злокачественных новообразований. В РФ заболеваемость УМ колеблется от 6,23 до 8 человек на 1 млн. взрослого населения в год по обращаемости [3, 18]. УМ - злокачественная внутриглазная опухоль меланоцитарного генеза, представляющая угрозу не только для зрения, но и для жизни УМ пациента. характеризуется агрессивным, прогрессирующим течением, высокой вероятностью метастазирования и летального исхода. Установлено, что через 5 лет у 50% пациентов с УМ после проведенного лечения диагностированы метастазы в печень» [7, 36, 40].

«Поиску факторов прогноза течения опухолевого процесса при УМ в последние годы уделяется особое значение [43]. За последние годы были выявлены некоторые анатомические, гистологические и молекулярно-генетические факторы, негативно влияющие на витальный прогноз при УМ: 1) локализация опухоли в цилиарном теле; 2) большие размеры опухоли; 3) экстрабульбарный рост; 4) эпителиоидноклеточный и смешанноклеточный тип УМ; 5) большое число митозов; 6) потеря одной копии хромосомы 3 (моносомия хромосомы 3); 7) дупликация длинного плеча хромосомы 8 и 8) профиль экспрессии генов класса 2 у пациентов с УМ (Gene expression profile 2) [2, 30, 101, 112, 124, 133]. Ряд авторов указывают на большее

значение молекулярно-генетических факторов в определении метастатического потенциала первичной УМ» [7, 12, 17, 81].

«Выявление хромосомных нарушений и мутаций в генах при УМ представляется наиболее перспективным способом прогнозирования заболевания. К наиболее характерным хромосомным перестройкам и нарушениям численности отдельных хромосом можно отнести моносомию хромосомы 3, что коррелирует с увеличением размера опухоли, вовлеченностью цилиарного тела, наличием в опухоли эпителиоидных клеток, полей оранжевого пигмента на поверхности опухоли, а также наличием замкнутых сосудистых петель. Данное хромосомное нарушение свидетельствует об участии расположенных в хромосоме 3 генов-супрессоров, вовлеченных в патогенез УМ. [8]. К наиболее «благоприятным» изменениям можно отнести появление избыточного хромосомного материала короткого хромосомы образование плеча или изохромосомы Приблизительно пациентов УМ обнаруживаются трети c структурные повреждения короткого плеча хромосомы 1, что сходно с нарушениями, наблюдаемыми при меланоме кожи. Данные изменения могут служить признаком опухолевой прогрессии» [12].

В последние годы особое внимание уделяется мутациям в генах при УМ. Доказана ассоциация генов *UVM1* и *UVM2* с развитием УМ, а также гена ВАР1 с предрасположенностью к опухоли. Показана мутаций GNAQ/GNA11, высокая частота В генах отвечающих за дерегуляцию пути МАР-киназы [163, 165]. Мутации в пути RAS-RAF-MEK-ERK и ассоциированное с ними метилирование гена RASSF1A [45, 62, 106], метилирование генов-семафоринов (SEMA3B) [39, 98], а также мутации в генах-транспортерах ATФ (генотипы CC и CT гена ABCB1/MDR1), приводящие к лекарственной

устойчивости при различных онкологических заболеваниях человека (рак желудка, немелкоклеточный рак легкого и т.д.) и увеличивающий риск возникновения заболевания на 30-40% — все эти изменения могут влиять на патогенез УМ [45, 102].

«Смертность при УМ остается достаточно высокой вследствие метастатической болезни, однако промежуток между диагностикой первичной опухоли и выявлением метастазов даже для пациентов с моносомией хромосомы 3 может составлять от нескольких месяцев до десятков лет [68]. Несмотря на накопленный опыт в области выявления генетических факторов, ответственных за развитие опухоли и метастазов, на сегодняшний день не выработаны четкие критерии прогнозирования течения неопластического процесса при УМ, а также не разработан алгоритм по раннему выявлению метастатической болезни. Анализ хромосомных нарушений и мутаций в генах проводится по ограниченному количеству генетических маркеров, что требует введения дополнительных критериев для оценки данных изменений (мутации В гене GNAQ/GNA11, определение мутаций в различных аллелях гена ABCB1/MDR1, метилирование генов *RASSF1A*, *SEMA3B* и другие)» [12].

Исходя из вышеперечисленного, **целью** настоящей работы является прогнозирование течения увеальной меланомы на основе анализа герминальных и соматических хромосомных нарушений и мутаций в генах. Для достижения означенной цели были поставлены следующие задачи:

1) Определить общую 5-летнюю онкологическую выживаемость при увеальной меланоме и ее взаимосвязь с соматическими молекулярно-генетическими изменениями (потеря одной

- копии хромосомы 3, делеция всего короткого плеча хромосомы 1, метилирование гена *RASSF1A*);
- 2) Определить частоту соматических хромосомных изменений при увеальной меланоме;
- 3) Определить частоту герминальных и соматических мутаций в генах при увеальной меланоме;
- 4) Выявить клинико-морфологические закономерности течения опухолевого процесса у больных с увеальной меланомой в соответствии с герминальными и соматическими молекулярногенетическими изменениями;
- 5) Выявить клинические, патогистологические и молекулярногенетические особенности увеальной меланомы с высоким риском метастазирования.

# Научная новизна

- Определены клинико-морфологические и молекулярногенетические особенности УМ с высоким риском метастазирования.
- Впервые на значительной выборке больных УМ показана частота таких хромосомных аберраций и мутаций в генах, как полная и частичная моносомия хромосомы 3, делеции всего короткого плеча хромосом 1 и 8, метилирование генов RASSF1A и SEMA3B, мутации в онкогенах GNAQ и GNA11, мутации в различных аллелях гена ABCB1/MDR1.
- Проведен комплексный анализ взаимосвязи вышеперечисленных изменений с клиническими и

патогистологическими особенностями УМ позволил выявить благоприятные и неблагоприятные в отношении витального прогноза факторы.

- Показана роль потери одной копии хромосомы 3 в снижении продолжительности жизни пациентов с УМ, а метилирования гена *RASSF1A* в ее увеличении.
- Впервые в мире в эксперименте in vivo показана роль генотипов полиморфного гена *ABCB1/MDR1* в развитии УМ, при этом установлено, что наличие генотипа *CC* достоверно свидетельствует о худшем витальном прогнозе.

#### Практическая значимость

На основании проведенного исследования доказано, что потеря одной копии хромосомы 3 наблюдается при неблагоприятном, а метилирования гена *RASSF1A* — при благоприятном витальном прогнозе. Выполненные исследования показали значимость определения статуса хромосомы 3 и метилирования гена *RASSF1A* для прогнозирования выживаемости при УМ. Выявление данных изменений при выполнении энуклеации, блокэксцизии или ТИАБ позволит спрогнозировать течение опухолевого процесса у пациента для определения его витального прогноза.

Убедительно показана роль гена *ABCB1* в развитии УМ и ассоциация пигментации опухоли, высоты опухоли и неблагоприятных морфологических типов УМ с генотипом СС сайта *C3435T* гена *ABCB1*. Определена высокая частота мутаций в онкогенах *GNAQ/GNA11* при УМ. Определение вышеперечисленных

изменений в лейкоцитах периферической крови пациента с УМ или у человека, находящегося в группе риска, позволяют выявлять УМ на доклинической стадии, а также прогнозировать возможность развития опухоли.

#### Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена дизайне ретроспективного И проспективного когортного открытого исследования c использованием клинических, инструментальных, молекулярно-генетических, цитогенетических и статистических методов.

### Основные положения, выносимые на защиту

- 1. Потеря одной копии хромосомы 3 в клетках опухоли свидетельствует об ухудшении, а метилирование гена *RASSF1A* об улучшении витального прогноза при УМ. Делеция всего плеча хромосомы 1р не влияет на витальный прогноз.
- 2. С помощью доказательной медицины определены клинические, морфологические и молекулярно-генетические особенности УМ с высоким риском метастазирования.
- 3. Проведенный анализ позволил определить частоту герминальных и соматических хромосомных и молекулярногенетических изменений при УМ.

4. Потеря одной копии хромосомы 3 в клетках УМ и генотип *CC* сайта *C3435T* гена *ABCB1* коррелируют с неблагоприятными прогностическими клиническими и патоморфологическими признаками.

# Внедрение результатов исследования

Результаты данного исследования внедрены в лекционную программу кафедры глазных болезней ФДПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова и в клиническую практику отдела офтальмоонкологии и радиологии МНИИ ГБ им. Гельмгольца для определения витального прогноза у группы пациентов с увеальной меланомой.

# Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности проведенных результатов исследования определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок исследований и обследованных пациентов с использованием современных инструментальных и молекулярно-генетических методов исследования.

Основные положения работы доложены и обсуждены на Spring Meeting of the European Ophthalmic Oncology Group (Paris, февраль 2012; Ivalo, март 2013; Krakow, март 2014), на European Association of Vision and Eye Research Meeting (Nice, октябрь 2012), на Научнопрактической конференции с международным участием «Российский общенациональный офтальмологический форум» (Москва, сентябрь

2012, сентябрь 2013, сентябрь 2014), на Междисциплинарном конгрессе по заболеваниям органов головы и шеи (Москва, май 2013, май 2014), Congress of the European Society of Ophthalmology (Сорепһадеп, июнь 2013), на Межрегиональной видеоконференции молодых ученых "Актуальные вопросы офтальмологии" (Москва, июнь 2014), на XXXVI Итоговой научной конференции Общества молодых ученых МГМСУ им. А.И. Евдокимова (Москва, апрель 2014), на межотделенческой конференции ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (Москва, 25 июня 2014 года).

# Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 7 - в центральной печати, 3 – в зарубежных изданиях.

# Структура и объем диссертации

135 Материал диссертации изложен страницах на машинописного текста. Работа состоит из введения, 4 глав (обзора литературы, материала И методов исследования, две результатов исследования и их обсуждения), заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа содержит 15 таблиц, 39 рисунков и 5 графиков. Список литературы включает 172 источника (30 отечественных и 142 зарубежных).

# Глава 1. Обзор литературы

# 1.1 Характеристика увеальной меланомы

# 1.1.1. Клиническая характеристика заболевания

«Увеальная меланома (УМ) относится к наиболее частым первичным злокачественным внутриглазным опухолям и составляет 12% от меланом всех локализаций и 90% от всех внутриглазных новообразований у взрослых [15]. Отмечены также отдельные случаи развития УМ у детей и подростков [16]. В различных регионах мира заболеваемость УМ неравнозначна: за год в ряде стран Западной Европы эту опухоль выявили у 7 из 1 млн. человек, в то же время в Испании, в Средней Азии и некоторых районах Италии этот показатель был значительно ниже (2 на 1 млн. населения), а в странах Скандинавского полуострова, напротив, было отмечено увеличение до 8-10 на 1 млн. человек [18, 168]. В РФ заболеваемость УМ по обращению в различных регионах варьируется от 6,23 до 8 человек на 1 млн. взрослого населения в год [18]. В Москве заболеваемость составляет, по разным данным, 11-13 случая на 1 млн. взрослого населения в год [6, 14]. УМ выявляют у пациентов в возрасте 30-80 лет, при этом пик заболеваемости приходится на пятоешестое десятилетие жизни» [12, 34].

«УМ возникает в результате злокачественного перерождения меланоцитов хориоидеи глазного яблока [120]. В генезе увеальной меланомы различают три механизма: возникновение ее *de novo* (чаще

всего), на фоне существующего хориоидального невуса или на фоне существующего окулодермального меланоцитоза» [12, 18].

«В связи с внедрением в медицинскую практику современных методов диагностики определение увеальной меланомы в настоящее время представляет меньше трудностей, чем в прошлом. Помимо офтальмоскопии, в диагностике увеальной меланомы используется эхография с цветовым доплеровским картированием, флуоресцентная ангиография, оптическая когерентная томография, а также магнитнотомография. Данные резонансная методы позволяют дифференцировать увеальную меланому других опухолей OTзлокачественная лимфома, (меланоцитома, хористома, невус, гемангиома хориоидеи, ретинобластома, ангиоматоз сетчатки, метастатическая опухоль) и опухолеподобных заболеваний (колобома хориоидеи, саркоидоз, хориоидит, гранулема и гамартома сетчатки, а также гиперплазия пигментного эпителия сетчатки различного генеза) [18, 20, 34]. При гистологическом исследовании удаленных глаз частота выявленных, но при этом не распознанных клинически случаев достигает 14%. Подобную высокую частоту можно объяснить многообразием клинических симптомов и их многочисленными комбинациями» [12, 18].

«Методы лечения включают в себя брахитерапию, локальную резекцию, энуклеацию пораженного глаза, а также транспупиллярную термотерапию. Увеличение выживаемости пациентов и сохранение глаза как функционального и косметического органа, - цель современных методов диагностики и лечения УМ» [12, 24, 34, 38].

«Витальный прогноз при увеальной меланоме очень низкий, при этом позднее выявление опухоли его значительно ухудшает [30].

У значительной части пациентов с УМ развиваются метастазы [19]. Уровень пятилетней выживаемости практически не изменяется в течение последних 45 лет, несмотря на ряд достижений в диагностике и лечении увеальной меланомы, [18, 34, 168]. Выживаемость пациентов в течение 5, 10 и 15 лет составляет, по разным данным, 65%, 52% и 46% соответственно [153]. На первые 3-4 года с момента установления диагноза приходится самая большая частота выявления метастазов [18]. Вместе с тем в литературе описаны случаи возникновения метастазов через 25 и даже 40 лет после лечения [55, 80]. Чаще всего метастазы выявляют в печени (86-94%), легких (23-47%), костях (15-30%) и коже (10-18%) [34, 153]. Выявление метастазов хотя бы до момента их клинического проявления могло бы значительно улучшить показатели выживаемости. Вместе с тем скрининговые обследования пациентов, осуществляемые с целью раннего определения метастазов, показали недостаточный уровень чувствительности. Продолжительность жизни после клинического выявления метастазов составляет не более 5-9 месяцев» [12, 34].

«Гематогенная диссеминация относится к основным путям распространения клеток из первичного очага. При этом первая микроциркуляторная сеть, оказывающаяся на пути опухолевых клеток, находится в легких. В связи этим преимущественную локализацию метастазов в печени нельзя объяснить особенностями системы кровообращения» [12, 34, 153].

«Ранее многие специалисты рассматривали энуклеацию как единственный способ предотвращения риска для жизни пациента. Основными причинами являлась возможность быстрого прогрессирования и большой риск развития метастазов даже для

малых меланом [34]. В ходе дальнейших исследований была выявлена совокупность характерных клинических и патоморфологических факторов, которые позволили разделить увеальные меланомы на «спокойные», с невысоким риском метастазирования, и более «агрессивные», для которых риск развития метастазов считался более высоким [59, 153]. В связи с наличием большого количества оцениваемых факторов и с разногласиями в оценке самих факторов данное разделение представляется в значительной степени условным» [12, 104].

# 1.1.2. Прогностическая значимость клинико-патоморфологических факторов

«Размер опухоли считается одним из наиболее значимых прогностических факторов [34, 59, 61, 69]. Считается, что большие опухоли имеют более неблагоприятный прогноз. Вместе с тем даже размеров опухоли приводит определенным сама оценка К противоречиям [73]. В прогностических целях было предложено определять наибольший размер опухоли, ее толщину и протяженность контакта со склерой [34]. Широко распространена классификация, предложенная в 1996 году Diener-West: опухоли предполагается разделить на малые (толщина < 3 мм, диаметр основания < 10 мм), средние (толщина 3-8 мм, диаметр основания 10-15 мм) и большие (толщина > 8 мм, диаметр основания > 15 мм). Для этих групп колебания отмечались значительные смертности В течение

пятилетнего периода (16%, 31%, 54% соответственно). Необходимо также отметить, что это разделение в значительной мере соответствует общепринятой в мире класссификации TNM ( $T_1 < 10$  мм,  $T_2 \sim 10$ -15 мм и  $T_3 > 15$  мм)» [12, 59].

«Многие исследователи считают, что локализация опухоли также имеет большое значение в развитии метастазов. Меланомы, локализующиеся в цилиарном теле, чаще склонны к метастазированию по сравнению с меланомами хориоидеи» [12, 153].

«Меланомы радужки коррелируют со значительно меньшей смертностью по сравнению с меланомами хориоидеи и цилиарного тела, в связи с чем они выделены в отдельную группу [34, 151, 163]. По характеру роста чаще определяют узловую и смешанную формы меланом радужки, при этом диффузный (анулярный) тип опухоли встречается достаточно редко. Витальный прогноз чаще всего благоприятен, метастазирование отмечается в 5-15%, зачастую при диффузных формах» [12, 18].

«Вследствие контакта с вортикозными венами эписклеральную инвазию увеальных меланом рассматривают как характерный критерий агрессивной опухоли [134]. При определении узлов УМ вне склеры 10-летняя выживаемость пациентов снижается в два раза» [12, 34, 52, 121].

«Увеальная меланома состоит из анаплазированных меланоцитов с большим ядром и одним или несколькими ядрышками начинает пролиферацию в наружных слоях хориоидеи. В 1931 году Callender предложил основанную на различиях в форме клеток классификацию увеальных меланом. Этой классификацией офтальмологи пользовались более пятидесяти лет [18]. Меланомы

разделяли на 6 типов: веретеноклеточный тип A и B, смешанный, фасцикулярный, эпителиоидный и некротический». [12]

«Веретенообразные клетки, напоминающие форме ПО неизмененные меланоциты, более дифференцированы. Эпителиоидные клетки, названные так из-за своей полигональной формы, более характерной для клеток эпителия. В эпителиоидных клетках сравнительно часто наблюдают митотические фигуры, при этом клетки имеют большие ядра с многочисленными ядрышками, а также более рыхлые межклеточные связи, чем веретенообразные. Во всех типах клеток может быть разная степень выраженности пигмента» [12, 121].

«В 1983 году McLean усовершенствовал классификацию Callender, при этом новая классификация предполагала разделение УМ на вида: веретеноклеточные, смешанноклеточные три эпителиоидноклеточные. Показано, что веретеноклеточные меланомы относительно благоприятный имеют исход В сравнении эпителиоидноклеточными УМ, при этом витальный прогноз при смешанноклеточной меланоме определяло преобладание эпителиоидных или веретенообразных клеток [34, 110]. Вопросы, дифференцировки промежуточных форм, в новой касающиеся классификации также были освещены недостаточно подробно, что в итоге вновь привело к субъективности в оценке витального прогноза» [12, 111].

«Работы по изучению ангиогенеза в УМ представляют большой интерес. По мнению Зиангировой Г.Г. (2006), именно клеткам пигментного эпителия принадлежит главная роль в создании собственного кровотока опухоли [9]. Предполагается, что клетки УМ

образуют вокруг себя структуру из экстрацеллюлярного матрикса, и именно эта структура становится затем основой для формирования собственного сосудистого русла. В одной из работ показано свойство межклеточного матрикса образовывать «петлеобразные» межклеточные структуры [75]. При этом показана ассоциация «петель» определенного типа, так называемых PAS (periodic acid-Schiff) — положительных петель, с неблагоприятными прогностическими факторами и развитием метастазов» [12, 113].

«Lane A.M. и соавт. (1997) предприняли попытку оценить степень васкуляризации УМ, но данных в пользу прогностической значимости данного фактора получено не было [103]. Sakamoto Т. и соавт. (1996) при изучении характеристик строения сосудистой системы опухоли обнаружили различные типы роста и группировки сосудов. Показано, что с плохим клиническим исходом ассоциировано строение микроциркуляторного русла в виде петли или сети» [12, 141].

«В работе Брендель Д.И. (2004)помимо степени васкуляризации автор изучил и наличие и степень выраженности кровоизлияний. По мнению автора, скорость роста опухоли и ее потенциал к метастазированию связаны с наличием собственной кровоизлияний. Полученные кровеносной сети И результаты продемонстрировали преобладание слабой и средней выраженности этих критериев. Выраженная степень васкуляризации чаще встречалась в группе пациентов с относительно благоприятным течением УМ. Данный фактор может быть свидетельством того, что неблагоприятное течение опухолевого процесса не всегда связано с

выраженным уровнем кровоснабжения, выявляемым на патоморфологическом уровне» [1, 12].

«Вопрос о прогностической роли степени пигментации при УМ остается до конца неизученным. В связи с меланоцитарным происхождением УМ уровень меланогенеза в известной степени должен влиять на течение опухолевого процесса [8, 9, 11, 87, 99]. Saornil M.A. (2004) предполагает, что большему риску подвержены люди со светлой кожей и светлыми радужками. У данной группы людей пигментация хориоидеи также слабовыраженная или умеренная [145]. Вместе с тем существует ряд предположений, что активная пигментация сосудистой оболочки при светлой радужке ассоциирована с большей активностью меланоцитов хориоидеи, что в свою очередь может иметь значение для патогенеза УМ» [12, 82].

«Спорный прогноза характер зависимости течения внутриглазной меланомы отмечается в целом ряде работ. Некоторые полагают, выраженная пигментация ЧТО относится неблагоприятным прогностическим факторам, по другим данным, слабопигментированные И беспигментные опухоли более «агрессивные», чем сильнопигментированные» [3, 5, 8, 10, 12, 41, 51, 77-79, 88, 116, 141].

«Такие факторы, как кровоизлияния, отслойка сетчатки и некротические изменения в увеальных меланомах носят случайный характер и не имеют прогностической значимости» [12, 59].

«Лимфоцитарную инфильтрацию при УМ расценивают как иммунный ответ организма на первичную опухоль. Она может отмечаться в разной степени выраженности. Одни авторы полагают, что выраженная лимфоцитарная инфильтрация в опухоли коррелирует

с благоприятным витальным прогнозом [18]. Согласно другим исследованиям, выживаемости ассоциируется снижение повышением количества лимфоцитов [149]. В работе Величко Л.Н. с соавт. (2004) был исследован характер взаимодействия между лимфоидными и опухолевыми клетками. На основании результатов исследования авторы преположили различные патоморфологические варианты УМ и возможность инвазии. Авторами было показано, что у более злокачественных гистологических типов опухоли (смешанноклеточного эпителиоидноклеточного) отмечадась И наиболее выраженная лимфоидная» [4, 12].

«Цитоморфологическая характеристика опухолевых клеток имеет определенное значение для витального прогноза, при этом оценивают размеры ядер, ядрышек, ядерных полей, а также степень митотического индекса клеток» [12, 18].

«Отдельным фактором прогноза при УМ можно считать временной показатель у пациентов после лучевой и химиотерапии. При его оценке учитывалась смертность больных в зависимости от пройденного после лечения времени [76, 108]. Manshot и van Strik полагают, что минимальный срок между диссеминацией процесса и смертью пациента от распространенной метастатической болезни составляет около 6 лет, а максимальный – 80. Авторы утверждают, что метастазирование происходит еще до лечения УМ, а местное терапевтическое влияние на опухоль не влияет на выживаемость на протяжении около 7 лет» [12, 108].

Таблица 1. Клинико-патоморфологические факторы и их связь с развитием метастатической болезни (d`Hermies, 2007, с дополнениями).

Характеристика	Прогностическая ценность
Пол пациента	Не имеет прогностического
	значения
Возраст пациента	У пожилых пациентов
	отмечаются худшие показатели
	выживаемости
Макроскопическое	
исследование:	
- высота опухоли	Витальный прогноз снижается
- диаметр опухоли	при увеличении высоты и диаметра
	основания опухоли
- локализация	Меланомы радужки имеют
	несколько лучший прогноз;
	неблагоприятным критерием считается
	вовлечение в опухолевый процесс
	цилиарного тела
- инвазия в	Критерий «агрессивности»
окружающие ткани	увеальной меланомы, при этом
	отмечается двухкратное снижение 5-
	летней выживаемости
- некрозы и геморрагии	Не имеет определяющего
на поверхности, отслойка	значения
сетчатки	
Микроскопическое	
исследование:	
- клеточный тип	Наличие эпителиоидных клеток
(веретеноклеточная,	коррелирует с низкими показателями

	1
смешанноклеточная,	выживаемости
эпителиоидноклеточная)	
- количество митозов	Данный критерий связан с
	гистологическим типом,
	прогностическая значимость –
	относительна.
- пигментация	Прогностическая значимость не
	доказана. Возможно, менее
	пигментированные опухоли имеют
	худший витальный прогноз
- лимфоцитарная	Для принятия определенного
инфильтрация опухоли	решения результатов недостаточно.
- наличие сосудистых	Высокая прогностическая
сетей и петель	ценность, коррелирует со сниженными
	показателями выживаемости
- данные	Для принятия определенного
иммунногистохимического	решения результатов недостаточно.
исследования	

«Клинические исследования показали практическую значимость клинических и патоморфологических критериев в оценке витального прогноза заболевания, несмотря на некоторую условность классификации и связанную с ней субъективность в оценке характера УМ [34]. На сегодняшний день очевидна необходимость создания комплексной системы прогнозирования течения увеальной меланомы

на основе генетических маркеров. Успехи молекулярной генетики открывают большие перспективы для использования ее в диагностике и оценке витального прогноза увеальных меланом» [12, 118].

# 1.2. Молекулярно-генетические изменения, выявляемые в увеальных меланомах

# 1.2.1. Хромосомные нарушения и идентификация генов, вовлеченных в канцерогенез при УМ

«Увеальная меланома относится к сложнонаследуемым И многофакторным заболеваниям, при ЭТОМ практически сопровождается накоплением признака [34, 67, 151]. В литературе описаны только несколько случаев, когда увеальная меланома была выявлена более чем у двух членов семьи, при этом было доказано менделевское распределение. Описания «синдрома наследственной увеальной меланомы», включающего в себя определенные симптомы, например, возникновение заболевания в раннем возрасте, поражение обоих глаз И предрасположенность развитию первичных злокачественных опухолей другой локализации (первичномножественные опухоли), также единичны [89, 132, 152]. В одной из работ была показана незначительная корреляция между увеальной меланомой и меланомой кожи, а также нейрофиброматозом I типа. Тем не менее, наличие предрасположенности пациентов

нейрофиброматозом I типа к возникновению увеальной меланомы в дальнейших работах показано не было» [12, 34, 151].

«Поиск генов, вовлеченных в патогенез увеальной меланомы, значительно осложнен из-за практического отсутствия накопления опухоли в семье (менее 0,3%) или корреляции ее с каким-либо наследственным состоянием, что ведет к невозможности проведения анализа сцепления данной патологии с определенным локусом в хромосоме. Именно с помощью этого метода удалось впервые описать первый ген-супрессор онкогенеза при ретинобластоме, что еще раз подчеркивает значимость метода для поиска генов-кандидатов» [12, 105].

«Таким образом, поиск характерных структурных изменений, а также другие подходы могут влиять на попытки определения генов, вовлеченных в патогенез увеальной меланомы. Тип аномалии играет большую Например, изменения, приводящие также роль. нарушению пролиферации, могут быть вызваны активацией геновсупрессоров опухолевого роста [127]. Напротив, онкогены, то есть положительные регуляторы клеточного цикла, могут определенным образом стимулировать пролиферацию и прогрессию опухоли [90]. Исследования, направленные на поиск и определение нарушений в сигнальных каскадах, ответственных за регуляцию клеточного цикла и дифференцировки, проводятся во многих странах [69, 147]. Не вызывает сомнений также значимость оценки эпигенетической генов-супрессоров, регуляции частности метилирования промоторных областей» [8, 12].

# 1.2.2. Хромосомные перестройки в УМ

«Значимую роль в изменении представлений о механизмах развития и прогрессии злокачественных новообразований сыграл анализ хромосомных перестроек в опухолях цитогенетическими методами. Хромосомный анализ позволяет оценить генетические нарушения на клеточном уровне и, помимо выявления численных хромосомных аберраций, предоставляет также информацию и о структурных перестройках, в том числе о транслокациях и других аберрациях, которые приводят к образованию химерных генов. После сообщений об определении первой ассоциированной с развитием злокачественной опухоли транслокации (Филадельфийская хромосома при хронической миелоидной лейкемии, 1960) было выявлено большое количество других хромосомных перестроек, связанных с опухолями кроветворной системы и напрямую ассоциирующихся с течением и прогнозом заболевания. В связи co сложностью культивирования клеток и широким разнообразием выявляемых хромосомных перестроек анализ солидных опухолей казался в эти малоэффективным и трудоемким [34]. Лишь в течение последних двадцати пяти лет, отчасти из-за увеличения количества исследований, и в связи с внедрением более эффективных методов в этой области были достигнуты определенные успехи [143]. В отличие от других опухолей, характеризующихся сложными и гетерогенными хромосомными перестройками, увеальная меланома считается удачным объектом для цитогенетического анализа: клетки УМ легко

культивировать, они содержат относительно постоянный хромосомный набор» [12, 13, 34].

«Целый методов, включающий флуоресцентнаяую ряд гибридизацию *in situ* (FISH) и ее модификации, такие мультиплекс-флуоресцентная гибридизация in situ (M-FISH), спектральное кариотипирование (SKY) и сравнительная геномная гибридизация (CGH), явлеются в настоящее время важным дополнением традиционного цитогенетического анализа» [12].

«Идентификацию хромосомных нарушений облегчает SKY/M-FISH, использование что позволяет одновременно визуализировать все хромосомы, окрашенные в разные цвета. Образцы геномной ДНК, конкурирующие за связывание, метятся красным и зеленым цветом при использовании СGH. Вдоль длины каждой измеряют соотношение красная-зеленая хромосомы флюоресценция. Делетированные амплифицированные ИЛИ хромосомные регионы выглядят более красными или более зелеными, а те, которые эквивалентно гибридизуются с двумя образцами, выглядят оранжевыми» [12].

«Наиболее характерные хромосомные перестройки и нарушения численности отдельных хромосом были идентифицированы в ходе исследований, проведенных для выявления генетических изменений в материале увеальной меланомы» [12, 34, 91, 96].

«Потеря целой хромосомы (моносомия хромосомы 3) является наиболее серьезным нарушением в увеальных меланомах. Все признаки, ранее ассоциированные с агрессивным поведением опухоли, включая увеличенный размер опухоли, вовлеченность в

опухолевый процесс цилиарного тела, наличие замкнутых сосудистых петель и наличие в опухоли эпителиоидных клеток, коррелируют с данным нарушением. Делеции короткого плеча хромосомы 1 также относятся к наиболее частым нарушением» [12, 34].

«Потеря хромосомного материала во всем коротком плече хромосом 6, 9, 15 и 21 и во всем длинном плече хромосом 15 и 22 определяется в незначительном проценте случаев» [12, 96].

Определение избыточного хромосомного материала в увеальных меланомах

8 и 6 наиболее «Хромосомы часто ассоциированы хромосомными нарушениями, связанными с появлением избыточного генетического материала. Данные нарушения появление 8q (где короткие плечи заменены изохромосомы появление лишних копий хромосомы 8, или амплификация региона 8q23-24, где располагается ген *c-myc*. Гиперэкспрессия генов *DDEF1* и NBS, которые также располагаются в указанном локусе, была обнаружена методом количественной ПЦР. Большой размер опухоли агрессивные патоморфологические характеристики ассоциируют с повреждением хромосомы 8» [12, 34].

«Появление избыточного хромосомного материала на коротком плече хромосомы 6 или образование изохромосомы 6, состоящей из двух коротких плеч, относится к наиболее частым нарушением в данной хромосоме. Признаки, характерные для относительно благоприятного прогноза, ассоциированы с данным нарушением, что ведет к ее обратной зависимости от моносомии хромосомы 3» [12, 34, 56].

«Достаточно редко в увеальных меланомах определяют дупликацию всего короткого плеча хромосом 2 и 9 и всего длинного плеча хромосом 2, 7, и 11, что вряд ли имеет большое значение для патогенеза опухоли» [12, 96].

«Вопрос, какие из цитогенетических нарушений играют непосредственную роль в развитии увеальной меланомы, оказывая влияние на экспрессию регуляторных генов, а какие являются вторичными событиями, происходящими при опухолевой прогрессии, остается неясным даже несмотря на определение большого количества неслучайных цитогенетических нарушений» [12, 119].

# 1.2.3. Анализ потери гетерозиготности в УМ

# Хромосома 3

«Наиболее частым нарушением, определяемым приблизительно в половине увеальных меланом, является потеря целой копии хромосомы 3 (моносомия хромосомы 3) [34]. Также необходимо отметить, что «изодисомия 3» определяется с достаточно высокой частотой (4-16%) [125]. Из-за возможности выявления «функциональной» моносомии хромосомы 3, а именно изодисомии хромосомы 3, являющейся результатом потери одной из хромосом и дупликации оставшейся, выявление моносомии хромосомы 3 с помощью микросателлитного анализа имеет важное преимущество перед другими цитогенетическими методами [122]. Прогностическое значение «моносомии 3» и «изодисомии 3» идентично, однако выявить изодисомию с помощью методов, основанных на подсчете числа хромосом, не представляется возможным» [12, 114].

«Необходимо отметить, что хромосомные перестройки в УМ обнаруживаются достаточно редко, в то время как для опухоли характерна именно потеря целой хромосомы. Гены, инактивация которых имело бы ключевое значение для патогенеза УМ, так и не на определены, несмотря выявление В ходе обнаруженных делеций в хромосоме 3 наиболее часто делетируемых 3p25, 3(р11-р13) и 3(q24-q26)[159]. Bo локусов многих опухолях человека злокачественных высокой частотой обнаруживается аллельный дисбаланс в хромосоме 3; известно, что гены-супрессоры опухолевого роста есть в как минимум трех участках в коротком плече хромосомы 3 [146]. При меланоме кожи, колоректальном раке, опухолях пищевода и печени, раке легкого определяется инактивация гена RASSF1A (3p21.3) в результате точечных делеций, мутаций или метилирования промоторной области [63]. Метилирование RASSF1A показано и в выборке из 39 первичных увеальных меланом с частотой 50%, и для клеточных линий увеальной меланомы (91%) [106-107]. *RASSF1A* является регулятором клеточного цикла; уменьшение его экспрессии нарушает контроль клеточного цикла в фазе  $G_1/S$  [55], он относится к супрессорам циклина D, гиперэкспрессия которого ведет к функциональной инактивации RB, что вызывает прогрессирование УМ. RASSF1A располагается в локусе р21.3 хромосомы 3, наиболее часто повреждаемой в клетках увеальной меланомы [17]. Метилирование при УМ выявляли в 70-83% случаев, потерю гетерозиготности в 50 % случаев (3p21.3)» [12, 13, 45, 161-162].

«Во многих типах опухолей выявляются делеции и иные повреждения гена *FHIT* (3p14.2). Для его белка подтверждена

способность подавлять опухолевый рост для его в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Причиной развития синдрома Хиппеля-Линдау являются молекулярные нарушения гена-супрессора *VHL*, локализованного в 3р25-26, также их выявляют при светлоклеточном спорадическом раке почки» [12, 117].

# Хромосома 1

«Для опухолей, которые происходят из клеток, мигрировавших эмбрионального В период развития ИЗ нервного гребня (нейробластома, менингиома, меланома кожи), главным образом характерны структурные повреждения короткого плеча хромосомы 1 [84]. Примерно у трети больных УМ обнаруживают хромосомные перестройки в 1р, схожие по структуре с нарушениями, выявляемыми меланоме кожи [34, 151]. В ряде работ показано, что наличие перестроек в коротком плече хромосомы 1 в УМ может быть признаком прогрессии опухоли. В исследовании Häusler и соавт. (2005) была выявлена статистически значимая (р=0.0001) корреляция между моносомией хромосомы 3 и делецией короткого плеча хромосомы 1» [12, 84].

# Хромосома 8

«В эпителиальных опухолях, таких как рак молочной железы, рак толстой кишки, мочевого пузыря, рак предстательной железы, головы и шеи, легкого, часто встречается область аллельных делеций, представляющая собой локус 8р12-р22. Эта область содержит не менее 55 генов, среди которых также можно выделить ряд опухолевых супрессоров: EGR3 (early growth response 3), LZTS1 (leucine zipper putative tumor suppressor-1), RHOBTB2 (Rho-related BTB domain-containing protein 2), TUSC3 (tumor suppressor candidate 3, N33), MTUS1

(mitochondrial tumor suppressor 1), PCM1 (pericentriolar material-1), TNFRSF10A и TNFRSF10B (tumor necrosis factor receptor superfamily member 10a и 10b), DBC-1 (deleted in breast cancer 1). Недавно идентифицирован ген-супрессор MTUS1; показано, что его продукт взаимодействует с рецептором ангиотензина 2 (АТ2) и угнетает клеточную пролиферацию и активацию ERK. Продукт гена PCM1 центросомным комплексом, что обусловлено клеточного цикла. Была показана его способность объединяться с с протоонкогеном JAK2 при лейкемии и протоонкогеном RET в капиллярных карциномах щитовидной железы. В регуляцию фазы клеточного цикла S-G<sub>2</sub>/М может быть вовлечен белковый продукт гена LZTS1. В злокачественных опухолях молочной железы были DBC-1 DBC-2 обнаружены гомозиготные лелеции И генов (RHOBTB2). Определено метилирование гена EGR3, являющегося транскрипционным фактором, при Т-клеточной лейкемии у взрослых. TNFRSF10A и TNFRSF10B являются рецепторами TNFSFI0 (3q26.33) сигнального каскада TRAIL, активация которого инициирует апоптоз» [12, 170].

«Частые делеции локуса 8p12-p22 были определены в метастазирующих первичных увеальных меланомах» [12, 91, 125].

## 1.2.4. Анализ генов, вовлеченных в патогенез УМ

Дерегуляция пути RAS-RAF-MEK-ERK или митогенактивируемого протеин-киназного пути (MAPK) — частое событие при

многих злокачественных опухолях человека [83]. Мутации в одном из компонентов этих молекулярных сигнальных путей вовлечены в онкогенез кожной меланомы. Многие из этих хорошо известных онкогенов (NRAS, BRAF) или генов-супрессоров опухолей (PTEN, CDKN2A) были изучены при УМ, при этом были выявлены случайные мутации в этих генах [148, 157]. Несмотря на то, что ни в одной из работ не показана взаимосвязь между мутациями в этих генах и метастатической болезнью, наличие соматических мутаций может быть основой для раннего выявления метастатических клеток в крови или для терапевтического вмешательства. Более многообещающими представляются недавние открытия двух мутированных генов-членов МАР-киназного сигнального пути, GNAQ и GNA11, а также гена ВАР1 [160].

# MAP-киназный сигнальный путь: GNAQ и GNA11

Van Raamsdonk и соавт. показали, что приблизительно в 80% при УМ возникает мутация в гене *GNAQ* или *GNA11*, что превращает их в онкогены [86, 163, 164]. Эти гены принадлежат к подсемейству генов, кодирующих α-субъединицу G-белка, вовлеченную в *MAPK*-сигнальную систему клетки. Мутации в α-субъединице G-белка *GNAQ* были выявлены в 46% случаев УМ, в то время как мутации в гене *GNA11* — в 35% случаев УМ с «диким» типом *GNAQ*. Гены взаимоисключающие, и в случае своего перехода в разряд онкогенов именно они могут служить причиной конститутивной активации *MAP*-киназного сигнального пути, что в свою очередь приводит к пролиферации клеток даже в отсутствие внеклеточных стимулов.

В 31 из 58 (54%) УМ заднего отрезка глаза и в 2 из 9 (22%) меланом радужки были выявлены соматические мутации в кодоне 209

гена *GNAQ* [128, 140]. В меланомах радужки мутации в гене *GNAQ* встречаются реже, при этом отмечены единичные случаи мутаций в гене *BRAF* [85, 128, 155, 164]. Для меланом конъюнктивы, напротив, характерны мутации в гене *BRAF*, в то время как *GNAQ* задействован редко [65]. Специфические мутации в генах *GNAQ/GNA11* также обнаруживают в 83% случаев голубого невуса кожи [152] на всех стадиях развития заболевания [155]. Принято считать, что наличие мутаций в этих генах относится к ранним событиям онкогенеза УМ, в связи с тем, что они не коррелируют с молекулярным классом опухоли или наличием метастазов [37, 128].

# Сигнальный путь RAS-RAF-MEK-ERK

Мутации в сигнальном пути *RAS-RAF-MEK-ERK* (*MAPK*) традиционно рассматривают как ранние события в онкогенезе [128]. Этот сигнальный путь активирует стимуляция аутокринного фактора роста или мутация генов BRAF или RAS [60, 115, 172], что приводит к выраженной клеточной пролиферации. Одиночная замена (p.V600E) встречается более чем в 90% случаев всех мутаций в гене BRAF при кожной меланоме, а также достаточно часто при доброкачественных и переходных невусах [58, 131]. Гены BRAF и NRAS активируют сигнальный путь МАРК, но мутации в этих генах при УМ чрезвычайно редки [50, 97, 142]. Несмотря на это, активация сигнального пути МАРК представляется достаточно частым событием при УМ за счет мутации GNAQ/GNA11, что в свою очередь приводит к активации G-белка и, возможно, активации ERK (внеклеточных сигнал-регулируемых киназ), молекуле киназного ряда, располагающейся ниже в сигнальном пути [46, 167]. Некоторые авторы также полагают, что активация МАРК при УМ усиливается

при одновременной активации сигнального пути PI3K-PTEN-AKT [172].

#### Сигнальный путь PI3K-PTEN-AKT

Ген-супрессор опухолевого роста гомолог фосфатазы и тензина (*PTEN*) вовлечен в сигнальный путь *PI3K* (фосфоинозитид 3-киназа) как отрицательный регулятор протеинкиназы В (АКТ). Прекращение функции гена *PTEN* в результате делеции или мутации приводит к активации AKT и гиперэкпрессии сигнального пути PI3K-PTEN-AKT, что в свою очередь предотвращает апоптоз клеток и вызывает их неконтролируемую пролиферацию [70, 92]. Инактивация РТЕЛ отмечается в 15% случаев УМ, и связана с увеличением анеуплоидии, а также с плохим клиническим прогнозом [32, 70]. Это подтверждает роль гена РТЕЛ на более поздних стадиях роста и развития новообразования. Активирующие мутации АКТЗ ΜΟΓΥΤ приводить к активации данного сигнального пути. Несмотря на это, в доступной литературе нам не удалось найти данных о наличии мутаций в *АКТЗ* у больных УМ.

Мутации в ген BAP1, ассоциирующиеся с развитием метастазов

В 84% случаев УМ II класса (профиль экспрессии генов класса 2 при УМ, GEP2) были выявлены соматические мутации в убиквитин карбоксил-терминал гидролазе *BRCA*-связанного белка 1 (*BAP1*) [83]. Ген ВАР1 расположен в локусе 21.1 короткого плеча хромосомы 3. Кодированный им белок является частью сигнальной системы убиквитин-протеасома, вовлеченной в развитие многих злокачественных новообразований, таких как карцинома легких, молочной железы и почек [83, 94, 129, 168]. Ряд авторов сообщают об

участии гена *BAP1* в формировании мультибелковых комплексов, вовлеченных в регуляцию экспрессии некоторых других генов, влияющих на различные внутриклеточные процессы [129]. Соматическая мутация в гене *BAP1* была выявлена лишь в 1 из 26 случаев УМ I класса (профиль экспрессии генов класса I при УМ, GEP1), при этом для УМ II класса (профиль экспрессии генов класса 2 при УМ, GEP2) частота составила 26 из 31 случаев. Мутации в гене *BAP1* относят к поздним событиям в онкогенезе УМ по сравнению с ранними мутациями в гене *GNAQ* [83].

Другие гены, вовлеченные в онкогенез УМ

В настоящее время изучаются некоторые гены-кандидаты, предполагаемо участвующие в онкогенезе УМ: DDEF1, NBS1, HDM2, LZST-1, APITD1, CCND1 и BCL-2 [35, 42, 57, 64, 71-72, 135, 162]. Роль большинства этих генов в онкогенезе УМ или прогрессировании метастатической болезни еще предстоит установить. Гиперэкпрессию гена *CCND1*, ведущую к активации циклин-зависимых киназ, выявляли в 65% случаев УМ [53, 54, 68]. Гиперэкпрессия *CCND1* ассоциируется большим размером опухоли, эпителиоидноклеточным типом и плохим витальным прогнозом [54]. При УМ, также как и в нормальных меланоцитах, отмечается высокий уровень экспрессии гена *BCL-2*. В ряде работ показано, что данная гиперэкспрессия способствует блокированию апоптоза [44, 48, 54], а также участвует в формировании резистентности к химиотерапии или облучению меланоцитов [68, 109].

Анализ литературных данных за последние 5 лет выявил наличие характерных для увеальной меланомы генетических и эпигенетических нарушений, встречающихся реже, чем

вышеперечисленные [171]. К ним можно отнести ген EFS (embryonal Fyn-associated substrate), локализованный на 14 хромосоме. Отмечено снижение экспрессии данного гена под воздействием метилирования (p=0,02). Данный ген относится к тканеспецифичным: метилирование в норме составляет 0%, в периферической крови при увеальной меланоме метилирование составляет 100% [123].

Landreville и соавт. (2011) изучали влияние гена *ABCB1* при метастатическом росте УМ. Было выявлено, что усиление экспрессии гена *ABCB1* приводит к усилению роста метастатических клеток [102].

Определенный интерес представляют гены семейства мир (мир-137, мир-17, мир-34а). Так, было показано, что в микроРНК при УМ происходит гиперэкспрессия гена мир-17, что связано неблагоприятным прогнозом [169]. Снижение уровня экспрессии гена мир-137, под действием метилирования ведет к усилению экспрессии генов МІТГ и СDК6 [49]. Гиперэкспрессиия мир-34а приводила к подавлению роста опухоли в клеточных линия меланом [130].

В одной из работ показано, что уровень экспрессии гена лизил оксидазы (lysyl oxidase) является маркером плохого прогноза, коррелирует с агрессивностью опухоли и быстрым появлением метастазов [33]

Прогрессирование опухоли и раннее развитие метастазов может быть обусловлено усилением экпрессии гена iNOS (57%) [87]. Ген LZTS1, локализованный в районе 8р12-р22, является потенциальным супрессором метастазирования. Отмечена высокая частота аллельных делеций в районе этого гена [126]. Снижение активности гена CDH1 приводит к пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток УМ [74].

#### Селективная генная терапия

Несмотря проводимую полихимиотерапию на ИЛИ комбинированное лечение, выживаемость пациентов с метастической болезнью при УМ остается крайне низкой, при этом отмечается высокая токсичность вводимых препаратов [156]. Традиционные химиотерапевтические препараты обладают высокой токсичностью в отношении всех клеток, включая нормальные, в связи с чем использование селективной терапии может представлять большой пациентов [158]. интерес данной категории Терапия, ДЛЯ направленная на изменение определенных узловых событий в сигнальных путях, развивается по мере накопления знаний о развитии и прогрессировании опухоли [158].

# 1.3. Ассоциация клинико-патологических факторов с молекулярно-генетическими нарушениями при УМ 1.3.1. Клинико-патоморфологические факторы

«Определенные ассоциации между молекулярными нарушениями и клиническими и патогистологическими факторами были определены для увеальных меланом. Так, в увеальных меланомах эпителиоидноклеточного или смешанноклеточного типа с высокой степенью достоверности выявляли моносомию хромосомы 3 [96, 120, 147, 154]. Потерю одной копии 3 также ассоциировали с такими клиническими и патоморфологическими признаками, как большой размер опухоли [147], наличием петлеобразных структур в матриксе [113], а также эписклеральной инвазией УМ» [12, 34].

«Увеличенный размер опухоли также ассоциирован с амплификацией длинного плеча хромосомы 8 [96]. Структурные нарушения хромосомы 6 не выявили статистически значимой ассоциации с какими-либо признаками, несмотря на то, что эти изменения выявляли в различных типах меланом [34]. Локализация опухоли в цилиарном теле была ассоциирована с делецией короткого плеча хромосомы 1» [12, 154].

## 1.3.2. Ассоциация с развитием метастазов

«Значимая ассоциация с образованием метастазов среди всех хромосомных нарушений, обнаруженных в увеальной меланоме, выявлена только для потери одной копии хромосомы 3. В 1996 году Prescher с коллегами сообщил о том, что моносомия хромосомы 3 коррелирует со снижением пятилетней выживаемости до менее чем 50% [133]. Другие авторы подтвердили это важнейшее открытие. В ряде работ было показано, что в отсутствие моносомии хромосомы 3 происходит крайне редко. метастазов При видимом отсутствии моносомии хромосомы 3 появление метастазов возможно объясняется частичными делециями в хромосоме 3 или изодисомией 3, функционально эквивалентной моносомии хромосомы 3. S. Lake и соавт. показали, что в увеальных меланомах потеря короткого плеча хромосомы 1 является вторичным событием по отношению к моносомии хромосомы 3. Совокупность этих нарушений определяет один из важных путей прогрессии увеальной меланомы. E. Kilic с

соавт. предположили, что одновременная потеря хромосомы 3 и короткого плеча хромосомы 1 приводит к существенному снижению показателей выживаемости [96, 100]. «Агрессивные» клинико-патоморфологические характеристики были ассоциированы с другими хромосомными нарушениями» [12].

«Нарушения В хромосомах 3 и 8 часто происходят одновременно; вместе с тем отмечено, что сниженная выживаемость c избыточным имеет значительную ассоциацию материалом хромосомы 8. Предположение, что для развития метастатической болезни необходимо наличие обоих нарушений, было опровергнуто в связи с тесной корреляцией между отдельно моносомией хромосомы 3 и смертностью в результате метастатической болезни» [12, 100].

«Одновременная потеря хромосомы 3 и появление избыточного материала в 6р для увеальных меланом не характерны, что обуславливает ассоциацию нарушений в хромосоме 6 с относительно благоприятным витальным прогнозом» [12, 34].

#### Резюме

«Высокая степень злокачественности УМ, высокий риск метастазирования и высокая смертность в течение 5-летнего периода после проведенного лечения обуславливают актуальность изучения эпидемиологических, клинических, гистологических и молекулярных особенностей патогенеза УМ. Многообразие проявлений УМ и необходимость дифференцирования опухоли с большим количеством

заболеваний глазного дна как опухолевой, так и неопухолевой природы приводят к затруднениям в диагностике УМ» [12].

«Задолго до диагностики первичной опухоли и начала лечения у значимой части пациентов с увеальной меланомой развиваются микрометастазы, при этом их клиническая манифестация происходит несколькими месяцами или годами позже. К настоящему моменту не существует эффективного лечения развернутой метастатической болезни, поэтому вряд ли можно ожидать значительного улучшения показателей выживаемости, расширяя возможности диагностики и лечения только первичной опухоли. Выделение пациентов, входящих в группу высокого риска развития метастазов, с помощью чувствительных и точных методов, в данном случае должно являться ключевым моментом» [12].

«Одним из возможных подходов к созданию диагностического теста является определение циркулирующих опухолевых клеток или молекулярных биомаркеров в периферической крови. Однако оба этих метода к настоящему времени не обладают достаточной специфичностью и чувствительностью, и не вполне соответствуют целям как можно более раннего выявления метастазов» [12].

«Другим подходом может служить анализ первичной опухоли на наличие признаков, по которым можно было бы прогнозировать развитие метастатической болезни. Выделяют множество клинических и патоморфологических особенностей УМ, каждая из которых имеет некую ассоциацию с развитием метастазов. Вместе с тем ни одна из данных особенностей не дает достаточно оснований для принятия решения о витальном прогнозе для больного УМ. Большое значение В ЭТОМ направлении имеет молекулярногенетический анализ увеальных меланом. В настоящее время моносомии хромосомы 3 (потери одной исследования копии 3) хромосомы проводятся В ряде крупных зарубежных офтальмолоонкологических центров вместе co стандартными диагностическими подходами для определения пациентов с высоким что определяется риском развития метастазов, наибольшей прогностической точностью по отношению к развитию метастазов. Анализ профиля экспрессии ряда генов показывает выраженную корреляцию с развитием метастазов. Широкому распространению этого метода в клинической практике препятствует некоторая анализа, доступность трудоемкость данного метода только определенных лабораториях, а также необходимость в сравнительном большом количестве РНК» [12].

«Определение статуса хромосомы 3 на сегодняшний день является наиболее предпочтительным прогностическим методом. Важное значение имеет также метод определения данного нарушения. Изодисомию 3, имеющую такое же прогностическое значение, как и моносомия хромосомы 3. невозможно определить подсчетом числа хромосом. В данном связанными случае оптимальным методом является микросателлитный анализ, позволяющий выявить аллельный дисбаланс в опухоли» [12].

«Промежуток времени между диагностикой первичной опухоли и выявлением метастазов даже для пациентов с моносомией хромосомы 3 может составлять от нескольких месяцев до десятков лет, в связи с чем нельзя исключить, что развитие метастазов определяется другими генетическими факторами, не имеющими связи с моносомией. Поиск других молекулярных маркеров УМ и оценка их

прогностического значения является актуальной задачей генетики и офтальмоонкологии» [12].

### Глава 2. Материал и методы

### 2.1. Клинико-инструментальные методы исследования

Клиническое исследование выполнено у 278 пациентов, которым была проведена энуклеация в период 2005-2007 и 2012 гг. Средний возраст пациентов составил 52,9±11,9 лет. Из них для настоящего исследования выделены 134 пациента. Критерием отбора пациентов было наличие ткани опухоли в базе Института и наличие образцов периферической крови, а также наличие хладагента в момент исследования. Средний возраст пациентов составил 52,9±11,9 Условно пациенты были лет. разделены на группы: ретроспективная – 104 пациента, пролеченные в период 2005-2007 г., и наблюдавшиеся в 2011-2012 гг., и проспективная группа - 30 пациентов, пролеченных в 2012 году.

В **ретроспективной** группе возраст пациентов составил 22 — 84 года (средний возраст  $53,7 \pm 12,2$  лет). Распределение по возрасту: женщин - 66 (63,4%), мужчин — 38 (36,6%). Срок наблюдения составил 41-84 месяцев (60,9  $\pm 8,8$  месяцев).

У 101 (97,1%) пациента было проведено ликвидационное лечение (энуклеация), у 3 (2,9%) пациентов по показаниям была проведена блокэксцизия опухоли. У 4 (3,9%) пациентов ликвидационному лечению предшествовало органосохранное (курс брахитерапии с применением Ru/Rh офтальмоаппликаторов).

По локализации выделяли меланому цилиохориоидальной зоны – 26 пациентов (25%), хориоидеи – 67 пациентов (64,4%),

радужки -4 пациента (3,9%) и иридоцилиохориоидальной зоны -7 пациентов (6,7%).

В **проспективной** группе возраст пациентов составил 23-72 года (средний возраст  $51,3\pm11,9$  лет). Распределение по полу: женщин - 18 (60,0%), мужчины – 12 (40,0%). Срок наблюдения составил 13-23 месяца  $(17,4\pm3,1$  месяца)

У всех 30 пациентов было проведено ликвидационное лечение (энуклеация). У 2 пациентов (6,7%) ликвидационному лечению предшествовало органосохранное (курс брахитерапии с применением Ru/Rh офтальмоаппликаторов + транспупиллярная термотерапия).

По локализации выделяли меланому цилиохориоидальной зоны -5 пациентов (16,7%), хориоидеи -22 пациента (73,3%) и иридоцилиохориоидальной зоны -3 пациента (10%).

Таким образом, обе группы были однородными и различались только по длительности наблюдения.

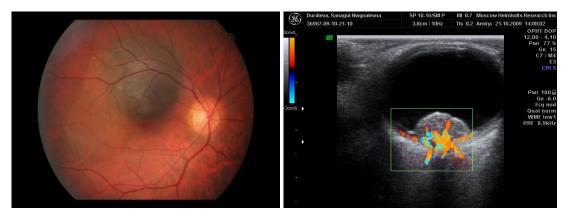
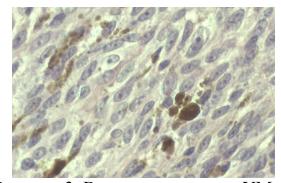


Рисунок 1. Клиническая картина УМ по данным офтальмоскопии. Рисунок 2. Кровоток в УМ по данным ЦДК.

Диагностика УМ основывалась на данных стандартного офтальмологического обследования (визометрия, тонометрия, периметрия, биомикроскопия, офтальмоскопия (см. рис. 1), гониоскопия). Весь комплекс клинических исследований выполнен

автором самостоятельно. Всем пациентам проводили эхографию глазного яблока, в ряде случаев при непрозрачных средах, малых размерах опухоли по показаниям проводили дуплексное сканирование в режиме цветового допплеровского картирования (аппарат GE Voluson 730 Pro, ФРГ; см. рис. 2) совместно с к.м.н., с.н.с. Амирян А.Г. в отделе ультразвуковых методов исследования, руководитель – профессор, д.м.н. Киселева Т.Н.), флюоресцентную ангиографию (к.м.н., н.с. Склярова Н.В.), оптическую когерентную томографию (к.м.н., м.н.с. Мякошина Е.Б.) (отдел офтальмоонкологии и радиологии, руководитель - профессор, д.м.н. Саакян С.В.) и компьютерную томографию орбит (по стандартной методике по месту жительства). Во всех случаях при проведении патогистологического исследование удаленного ПО стандартной глаза методике верифицирована увеальная меланома (см. рис. 3 и 4). Исследования проводили совместно с к.м.н. Захаровой Г.П. и к.б.н. Андреевой Л.Д. (отдел патологической анатомии и гистологии глаза, руководитель – проф., д.м.н. Хорошилова-Маслова И.П.)



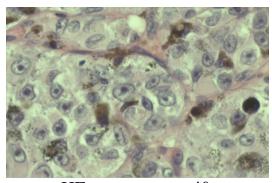


Рисунок 3. Веретеноклеточная УМ, окраска НЕ, увеличение 40х.

Рисунок 4. Эпителиоидноклеточная УМ, окраска НЕ, увеличение 40х

«В общеклиническое обследование входил общий осмотр пациента, рентгенография органов грудной клетки, УЗИ органов брюшной полости, при необходимости компьютерная томография

головного мозга, термография лица и шеи, УЗИ лимфоузлов, сцинтиграфия, консультация онколога, заключения специалистов» [7].

«Лабораторные исследования включали проведение общего анализа крови с лейкоцитарной формулой, общего анализа мочи и биохимического исследования крови» [7].

При сборе анамнеза выясняли факт проживания в местах с неблагоприятной экологической обстановкой, наличие профессиональных вредностей, отягощенной наследственности по онкологическим заболеваниям, сопутствующей патологии, времени от начала появления первых жалоб до обращения к врачу.

# 2.2. Методика молекулярно-генетического и цитогенетического исследования УМ

Исследования у ретроспективной группы пациентов (n=104) проводили на базе лаборатории молекулярной генетики Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (заведующий лабораторией – д.б.н., проф. Д.В.) совместно Скляровой H.B. Залетаев cК.М.Н. офтальмоонкологии и радиологии МНИИ ГБ им. Гельмгольца, руководитель отдела – профессор, д.м.н. Саакян С.В) [28, 138, 139]. У проспективной группы пациентов (n=30) молекулярно-генетические базе лаборатории молекулярной исследования проводили на диагностики и геномной дактилоскопии НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов (заведующий лабораторией – д.б.н., проф. Носиков В.В.) совместно с к.б.н. Логиновым В.И. и Бурденным А.М., по расширенной методике (изучение полной и частичной

моносомии хромосомы 3, метилирования гена *SEMA3B*, мутаций в генах *GNAQ* и *GNA11*, полиморфизма гена *ABCB1*). [20, 21, 23, 26, 27, 140]. В связи с многофакторностью исследуемого заболевания герминальные мутации не изучались.

### 2.2.1. Выделение геномной ДНК из ткани

«После энуклеации пораженного глаза биопсийный материал опухоли и относительно неповрежденной хориоидеи, а также образцы периферической крови (консервант: 0.5М раствор ЭДТА) сохраняли при –20°С. Для исследования образцов ТИАБ материал собирали с цитологических препаратов» [11].

«ДНК из ткани выделяли по следующей методике:

1) Замороженную измельченную ткань (100-200 мкг) смешивали с 650 мкл раствора для выделения следующего состава:

10 мМ Трис-HCl, pH 7.8

0,005 М ЭДТА

0,1 M NaCl

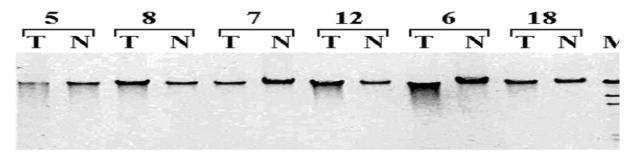
1% SDS

- 2) Добавляли протеиназу К до конечной концентрации 100 мкг/мл, SDS до конечной концентрации 0,6% и 28 мкл 1 М DTT. Образец перемешивали.
- 3) Образец инкубировали сначала 10 мин при  $65^{0}$ С и затем 16 часов (ночь) при  $37^{0}$  С.
- 4) Проводили экстракцию белков фенолом. К образцу добавляли 500 мкл фенола, уравновешенного буфером Трис-HCl, рН 8.0, плавно перемешивали. Затем образец центрифугировали 2

минуты при 10000 об/мин, водную фазу отбирали в чистую пробирку. Этап повторяли два раза.

- 5) Аналогично проводили экстракцию смесью фенолхлороформ (1:1). Этап повторяли до отсутствия осадка на интерфазе после центрифугирования.
- 6) Аналогично проводили экстракцию хлороформом. Этап повторяли два раза.
- 7) К образцу добавляли 1/10 объема 3 М ацетата амония, pH 5.2, 1.5 мкл тРНК и 2.5 объема охлажденного до  $-20^{\circ}$ С 96% этанола. Образец выдерживали ночь при  $-20^{\circ}$ С.
- 8) Образец центрифугировали 15 мин при 10000 об/мин. Осадок ДНК два раза промывали в 80% этаноле, высушивали на воздухе и растворяли в 30 мкл буфера ТЕ рН 8.0.» [11]

«Качество и примерную концентрацию ДНК определяли с помощью электрофореза агарозном геле. Пример электрофоретического разделения образцов геномной ДНК в 0.8% агарозном геле представлен на рис. 5. В лунки наносили по 2 мкл образцов ДНК буфере, 0.25% исследуемых В содержащем бромфенолового синего, 0.25% ксиленцианола и 30% глицерина в воде. В качестве стандарта использовали ДНК фага лямбда, расщепленную рестриктазой *Hind*III, с известной концентрацией. Электрофорез проводили при 100В. Гель окрашивали в растворе, 0.5 содержащем мкг/мл бромистого Картину этидия.



**Рисунок 5. Картина электрофоретического разделения препаратов ДНК в 0.8% агарозном геле. Т** – ДНК из опухолевой ткани;

**N** − ДНК из нормальной ткани; **M** − маркер  $\lambda$ / *Hind*III

электрофоретического разделения геномной ДНК наблюдали и фотографировали в проходящем УФ свете. Точную концентрацию определяли спектрофотометрически по соотношению оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм. В использованных образцах это соотношение ( $A_{260}/A_{280}$ ) составило 1.8–2.0, что соответствует содержанию ДНК более 70%» [11].

### 2.2.2. Анализ потери гетерозиготности

«Для анализа аллельных потерь были использованы микросателлитных маркеров (приведены в таблице 2). Панели включала как ди-, так и три- и тетрамерные маркеры, выбранные из базы данных CHLC (Cooperative Human Linkage Center) и GDB (Genome Data Base)» [11].

«В дополнение к широко применяемым СА-повторам были выбраны более новые три- и тетрамерные маркеры. Их характеризует высокая гетерозиготность И простота электрофоретического ПЦР, не требующая такого продуктов разделения разрешения, как в случае димерных повторов (2 п.н.). В отличие от димерных повторов картины электрофоретического разделения три- и тетрамерных повторов не содержат теневых полос. Синтез олигонуклеотидных последовательностей праймеров был выполнен в фирме Евроген (Россия). Перед проведением анализа, ДНК была нормализована. Отличие в концентрациях образцов внутри пары составляло менее 5%» [11].

# 2.2.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

«ПЦР проводили на амплификаторах BioRad (Англия) и Терцик (Россия) по программе:

- 1) предварительная денатурация при  $95^{0}$ C 2 мин
- 2) 35 циклов, состоящих из:
- а) денатурация при  $94^{0}$ C 10 с
- б) отжиг праймеров при  $T_{\text{отж}} 25 \text{ c}$
- в) синтез продукта при  $72^{0}$ C 20c
- 3) заключительный синтез при  $72^{0}$ C 4 мин

Реакционная смесь для амплификации объемом 20 мкл содержала 67 мМ Трис-HCl, pH 8.8; 16.7 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% твин-20; 0.25 мМ каждого dNTP; 0.05-0.1 мкг геномной ДНК; 20 пмолей каждого праймера; 1-2 ед. Таq полимеразы; MgCl<sub>2</sub> в концентрации 1.5-2.5 мМ» [11].

 Таблица
 2.
 Параметры
 17
 микросателлитных
 маркеров,

 использованных в LOH-анализе.

Маркер *	Локализация**	Структура праймеров	Т <sub>отж/</sub> Мg, мМ	Продукт ПЦР п.н.
D1S503	1p36.22	CTACCTGCGGGGACAC ACACTGGGTTGAGGGC	57°C/1.5	203-213
D1S2736	1p36.22	CCTCCAGGGTATTCTTGG TTTTTGAGGTGTGAGAGCAG	57°C/1.5	122-132
D1S1635	1p36.22	GTGTGGTCAACACAGCAAGA AAACAAAGGTAATAAACTTACCACC	57°C/1.5	152-168

D1S2672	1p36.21	ATCCATCTTGGTGGCTTTG GTGGGTGTGGGACCATTC	57 <sup>0</sup> C/1.5	134-158
D8S1715	8p12-p22	CAGGTGATGTCCCAGAGG CGAACATGAATTAGAAATCCAGTG	60°C/1.5	111-131
D8S258	8p12-p22	CTGCCAGGAATCAACTGAG TTGACAGGGACCCACG	60°C/1.5	144-154
D3S1317	3p25.3	TACAAGTTCAGTGGAGAAC C CCTCCAGGCCATACACAGT CA	58°C/1.0	159-171
D3S1038	3p25.3	TCCAGTAAGAGGCTTCCTA G AAAGGGGTTCAGGAAACCT G	55°C/1.0	115-135
D3S2409 , ATA10H 11	3p21.31	GGTGACAGAGACTCTTGTC TCA CATTCTGGTTGGGGAACAT A	58 <sup>0</sup> C/1.0	115-127
D3S2456 , GATA63 E04	3p21.31	CATTCTTCAGCATATGGATA TCC GAGTGAGACCCTGTCTCAG G	58 <sup>0</sup> C/1.5	115-135
D3S4614	3p21.31	GCTGAGAAATCTCAATTGT GGGTG GGCTGCTGAGCAGTGTCAG AC	58°C/2,0	125-147
D3S4597	3p21.31- p21.2	TGTTCCCTTCCCTATAAACA GAT GAAAGCAAGGAAGGCACAT G	55°C/1,5	167-177
D3S4103	3p21.1	TTCTACTGCAATCCAGCCTGG GCCTTGGGTAGATTTATACCT  55°C/1.0		115-135
D3S1481	3p21.1	ATTATACCTCTTTGTAGC	55°C/2.0	83-104

		GATG(C/G)ATATTGTTAGTC		
		С		
D3S2459	3q12.3	CTGGTTTGGGTCTGTTATGG	60°C/1.5	175-203
		AGGGACTTAGAAAGATAGCAGG	00 C/1.3	173-203
D3S3520	3q	ATATTAACTTGAAAAGGCAACA	60°C/1.5 136-150	
D333320	Эq	CCTAATTTATCTGTCGTGTGTG	00 C/1.3	130-130
D3S2398	3q27	AGCCTGAGCAAAACAGTGAA	60°C/2.0 266-298	
		GAAGACCTACGGATTGGGTC	00 0/2.0	200-276

<sup>\*</sup> Для три- и тетрамерных микросателлитов приведены также их краткие названия из базы данных CHLC (Cooperative Human Linkage Center); 
\*\*Данные NCBI Build 37 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/map\_search)

# 2.2.4. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации

«Для анализа продуктов амплификации использовали предварительно 2% агарозные гели, а затем полиакриламидные гели» [11].

«Продукты амплификации три- и тетрамерных локусов, а также димерных локусов с длиной продукта до 220 п.н. разделяли электрофоретически в вертикальном блоке 8%-12% полиакриламидного геля в 1хТВЕ буфере при напряженности электрического поля 15 V/см. ПААГ толщиной 0.7 см дополнительно содержал 7% глицерина. Использовали неденатурирующий ПААГ с соотношением акриламид: N,N'-метиленбисакриламид 29:1, для разделения продуктов ПЦР димерных локусов с длиной аллеля до 220

п.н. это соотношение составляло 19:1. На одну дорожку наносили 5-15 мкл амплификата» [11].

«В качестве маркеров использовали ДНК плазмиды pUC19, расщепленную рестриктазой MspI, а также маркер с шагом 100 п.н. (100 bp DNA ladder)» [11].

«Полиакриламидные гели окрашивали в растворе, содержащем 0.5 бромистого этидия. Картину электрофоретического мкг/мл разделения геномной ДНК наблюдали и фотографировали проходящем УФ свете. Потерю гетерозиготности (LOH) выявляли при анализе разделенных в ПААГ продуктов ПЦР, проведенной на препаратах ДНК. выделенных ИЗ опухолевого материала контрольной (нормальной) ткани. Для анализа LOH сравнивали интенсивность аллелей высокого (Н-аллели) и низкого молекулярного веса (L-аллели) в соответствующих парах опухоль/норма. Случаи с уменьшением интенсивности одного из аллелей на 50% и более рассматривали как LOH. Примеры приведены на рис. 2 и 3» [11].

## 2.2.5. Метил-чувствительный рестриктный анализ (МЧРА)

«Метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз оставлять негидролизованными участки ДНК, содержащие 5-метилцитозин вместо цитозина. ДНК последовательно инкубировали с *Hpa*II (CCGG) и *Hha*I (GCGC), метил-чувствительными рестриктазами и *Msp*I (CCGG), метил-нечувствительной рестриктазой, и полученные фрагменты использовали в качестве матрицы для ПЦР. С этой целью 0.5 мкг геномой ДНК обрабатывали 5 ед. рестриктазы в 25

мкл инкубационной смеси в течение ночи. Расщепление ДНК при 37°C рестриктазами *Hha*I, *Hpa*II и *Msp*I проводили в буфере Y. Состав буферов приведен в протоколах фирм "MBI Fermentas". Для амплификации использовали 2.5 мкл гидролизованной ДНК. При проведении ПЦР учитывалось наличие внутренних сайтов узнавания для используемых рестриктаз в амплифицируемом участке (табл. 3). Если все участки узнавания данной рестриктазой, расположенные внутри фрагмента, содержат только 5-метилцитозин, то они не расщепляются, и продукт ПЦР выявляется в геле» [11].

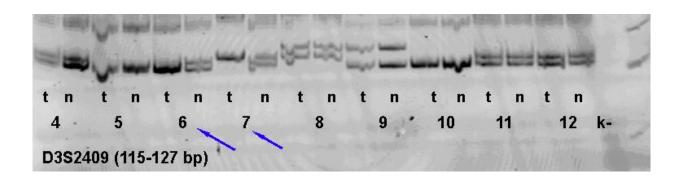


Рисунок 6. Картина электрофоретического разделения продуктов ПЦР для тетрамерного локуса D3S2409 в 10% неденатурирующем ПААГ с окрашиванием бромистым этидием; Т — продукт амплификации ДНК из опухолевой ткани; К — продукт амплификации ДНК из крови. (→) — отмечена потеря аллеля (LOH)

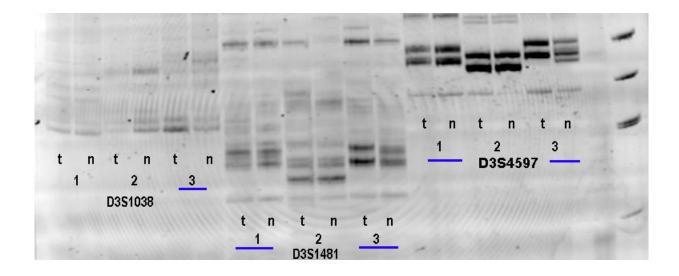


Рисунок 7. Картина электрофоретического разделения продуктов ПЦР для динуклеотидных локусов D3S1038, D3S1481 и D3S4597 в 10% неденатурирующем ПААГ с окрашиванием бромистым этидием; Т — продукт амплификации ДНК из опухолевой ткани; К — продукт амплификации ДНК из крови. Синим подчеркиванием отмечена потеря аллеля (LOH);

Таблица 3. Доля СрG-пар, исследованных в промоторных областях 3 генов.

Гены	Рестриктазы, число сайтов/ число анализируемых СрG пар		Общее количество СрG пар	Доля проанализированных СрG пар относительно их общего количества
	HpaII	HhaI		
RASSF1A	3/3	6/6	32	18/32, 56%

«В отсутствие метилирования хотя бы одного участка узнавания данной рестриктазой анализируемый фрагмент

расщепляется и ПЦР-продукт определить невозможно. Структура олигонуклеотидных праймеров и условия ПЦР приведены в табл. 3. Амплификацию проводили по программе:

 $95^{0}$ С, 2 мин; 35 циклов  $\{92^{0}$ С, 20 с;  $T_{\text{отж}}$  (табл. 8) – 40 с;  $72^{0}$ С, 20 с $\}$  и  $72^{0}$ С, 4 мин» [11].

Таблица 4. Параметры использованных маркеров для МЧРА.

Маркер	Структура праймеров	T <sub>отж/</sub> Mg,	Продукт ПЦР, п.н.	
		мМ***		
K1*	TGCCCTCTGGACTGGAACCT	64 <sup>0</sup> C	445	
	CCTGAGCCCAGCCCAAGTC	1,5	443	
K2**	AGAGTTTGATGGAGTTGGGT	62°C	229	
KZ	CATTCGGTTTGGGTCAATCC	1,5		
	GTAAAGCTGGCCTCCAGAAACA	65°C		
DAC	CGG	2,5	357	
RAS	GCAGCTCAATGAGCTCAGGCTC			
	CCC			

<sup>\*</sup> Контроль полноты гидролиза ДНК.

«Полноту гидролиза ДНК оценивали с помощью ПЦР фрагмента гена β-3A-адаптина (К1, 445 п.н., ID GenBank AF247736.2), который содержит участки узнавания используемых рестриктаз.

<sup>\*\*</sup> Контроль сохранности ДНК.

<sup>\*\*\*</sup> Состав используемого буфера 67 мМ Трис-HCl, pH 8.8; 16.7 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% твин-20.

Однако в этом фрагменте не выявлено метилирования CpG-пар ни в нормальной ткани, ни в опухоли (табл. 4)» [11].

«Сохранность ДНК после гидролиза оценивали с использованием в качестве контроля фрагмента экзона 1 гена *RARβ2*, который не содержит участков узнавания указанных рестриктаз (К2, 229 п.н.) (табл. 4). В качестве положительного контроля была использована клеточная линия фибробластов L-68 обработанная метилазой *Sss*I, в соответствии с протоколом (СибЭнзим). В качестве негативного контроля использовались клеточная линия фибробластов L-68 и ДНК выделенная из лейкоцитов крови» [11].

«Для наглядности продукты ПЦР исследуемого и двух контрольных фрагментов разделяли одновременно в 2%-ном агарозном геле и затем фотографировали (рис. 8). Положительным контролем служила негидролизованная ДНК» [11].

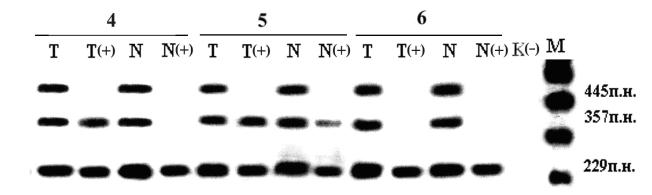


Рисунок 8. Применение метода МЧРА для анализа метилирования промоторного района гена *RASSF1A*.

**Б**: «Применение МЧРА: электрофоретическое разделения в 2%-ном агарозном геле продуктов ПЦР, полученных для ДНК из

четырех образцов RCC до и после (+) гидролиза метилчувствительной рестриктазой AciI. Контроль полноты рестрикции – фрагмент 445 п.н.; контроль целостности ДНК – фрагмент 229 п.н.; анализируемый фрагмент гена RASSF1A – 357 п.н. (табл. 3).  $\mathbf{K}$ (–) – отрицательный контроль (в отсутствие ДНК).  $\mathbf{M}$  – маркер с шагом 100 п.н» [11].

### 2.3. Диспансеризация больных с увеальной меланомой

«Диспансерное наблюдение осуществляли в соответствии с приказом № 135 МЗ РФ от 19.04.1999 один раз в 3 месяца в течение первого года, затем один раз в 6 месяцев в течение второго года, в дальнейшем — один раз в год во взрослом консультативно-поликлиническом отделении МНИИ ГБ им. Гельмгольца. Пациенты, которые по различным причинам не могли приехать на контрольный осмотр, сообщали о себе по телефону, факсу и через родственников путем передачи справок от онкологов и офтальмологов с места жительства. Часть данных получена путем запросов в региональные департаменты здравоохранения по месту жительства пациентов» [7].

# 2.4. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка результатов проведенного исследования проводилась методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической (М), стандартной ошибки среднего арифметического (m), стандартного отклонения (σ). Для проверки достоверности различий средних значений между группами использовались методы параметрической статистики (точный

критерий Стьюдента). Различия критерий Фишера, считались достоверными при р < 0,05. Для исследования выживаемости лечения использовался статистический пациентов после множительных оценок Каплана-Мейера, а для оценки различия между двумя выборками – двухвыборочный критерий Вилкоксона (Манна-Уитни) и регрессионная модель Кокса. Для анализа полученной информации все наблюдения были разделены цензурированные (незавершенные), в которых исход не наступил на момент окончания исследования (пациенты живы), либо пациенты выбыли из исследования (в том числе смерть от других причин) и нецензурированные (завершенные), при которых зафиксирована пациента от метастатической болезни. Статистическую смерть обработку результатов при оценке полиморфизма генов проводили с использованием закона генетического равновесия Харди-Вайнберга для аутосомных признаков. При сравнении частот встречаемости генотипов применяли критерий Пирсона, а для малых выборок точный критерий Фишера. Комплексную оценку взаимосвязей между исследуемыми группами проводили с использованием логистической регрессии, определяя отношение шансов (OR)95%-ным доверительным интервалом (CI) с уровнем значимости принятым 0,05. Рассматривали также результаты статистически маргинально значимые (0,05 < P  $\leq$  0,1), ЧТО соответствует интервалу 94% доверительному (в отличие otстандартного доверительного интервала 95% при р = 0,05). Расчеты проводили в пакетах программ для Windows (Microsoft Excel, STATISTICA 6.1 RUS).

# Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение. Ретроспективная группа

# 3.1. Ассоциация клинико-морфологических особенностей с молекулярно-генетическими изменениями в клетках увеальной меланомы

Общее количество пациентов в ретроспективной группе составило 104 человека, из них женщин 66 (63,4%), а мужчины — 38 (36,6%). Все пациенты проходили хирургическое лечение в отделении офтальмоонкологии и радиологии МНИИ ГБ имени Гельмгольца в период с октября 2005 г. по ноябрь 2007 г. Возраст пациентов составил 22 - 84 года (средний возраст  $53,68 \pm 8,7$  лет, см. рис. 9). Срок наблюдения составил 41-84 месяцев (60,9 $\pm 8,8$  месяцев). Высота опухоли составила 1-17 мм (9,3 $\pm 2,7$  мм), диаметр основания опухоли 7,3-21 мм ( $15,7\pm 3,6$  мм) (см. рис. 10 и 11).

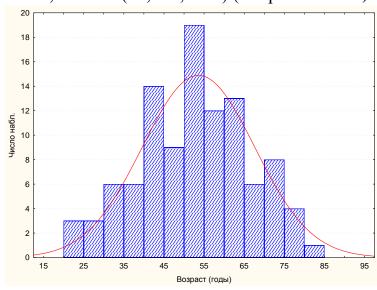


Рис 9. Распределение пациентов по возрасту.

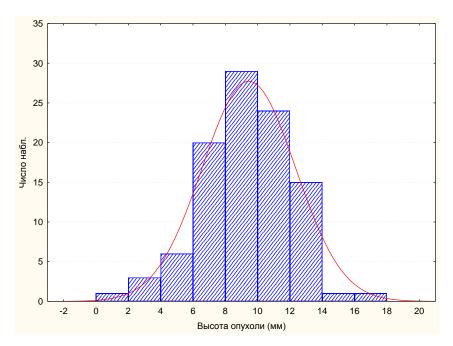


Рис. 10. Распределение пациентов по высоте опухоли.

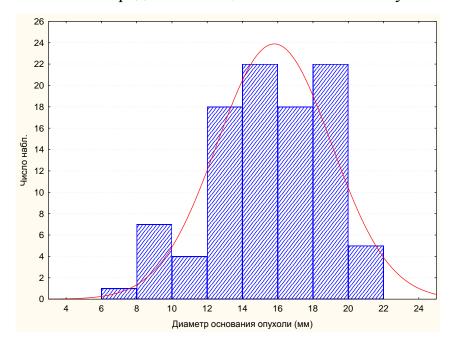


Рис 11. Распределение пациентов по диаметру основания опухоли.

У 101 (97,1%) пациента было проведено ликвидационное лечение (энуклеация), у 3 (2,9%) пациентов по показаниям была проведена блокэксцизия опухоли. У 4 (3,9%) пациентов ликвидационному

лечению предшествовало органосохранное (курс брахитерапии с применением Ru/Rh офтальмоаппликаторов).

По локализации выделяли меланому цилиохориоидальной зоны — 26 пациентов (25%), хориоидеи — 67 пациентов (64,4%), радужки — 4 пациента (3,85%) и иридоцилиохориоидальной зоны — 7 пациентов (6,73%) (см. рис. 12).

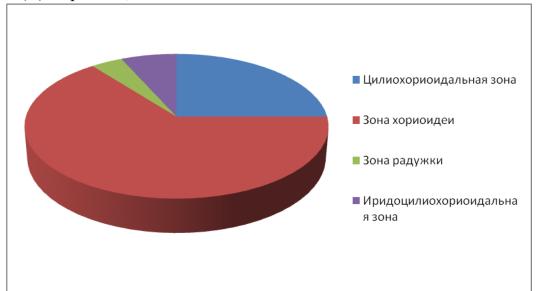


Рисунок 12. Распределение пациентов архивной группы по локализации опухолевого процесса.

На основе проведенного молекулярно-генетического анализа все пациенты были разделены на 4 группы: 1 группа - пациенты с потерей одной копии хромосомы 3 в клетках опухоли (моносомией хромосомы 3) — М3 (n=45, 43,3%), 2 группа - с делецией всего короткого плеча хромосомы 1 (потерей гетерозиготности в хромосоме 1р) (n=30, 28,8%), 3 группа — с метилированием гена *RASSF1A* (n=23, 22,1%) и 4 группа сравнения (n=29, 27,9%), у которых не было выявлено ни одной из исследуемых молекулярно-генетических аберраций.

В 13,5% случаев (n=14) мы отмечали наличие у одного пациента как моносомии хромосомы 3, так и потери гетерозиготности по хромосоме 1р. В 5,8% случаев (n=6) были выявлены одновременно моносомия хромосомы 3 и метилирование гена *RASSF1A*. Сочетание делеции всего короткого плеча хромосомы 1 и метилирования гена *RASSF1A* у одного пациента было обнаружено у 8,7% исследуемых (n=9). Наконец, сочетание трех молекулярно-генетических аберраций выявлено у двоих пациентов (1,9%) (см. рис.13).

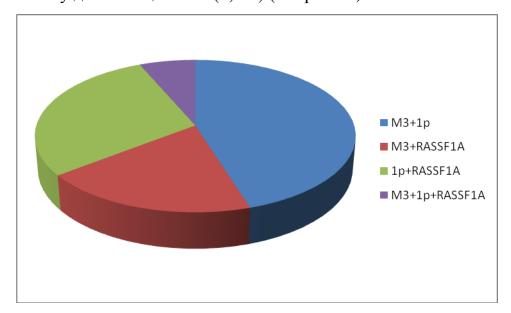


Рисунок 13. Сочетание двух и более молекулярно-генетических аберраций у пациентов архивной группы.

Для каждой групп приведены ИЗ клинические И патоморфологические характеристики (см. Табл. 5). Молекулярногенетические изменения сопоставляли c такими клиникоморфологическими факторами, как возраст и пол пациента, высота и диаметр основания опухоли, гистологический тип, вовлечение в процесс цилиарного тела, наличие пигментации, гемофтальма, отслойки сетчатки, субретинального экссудата, видимых собственных сосудов опухоли, экстрабульбарного роста и отягощенного семейного анамнеза ПО онкопатологии. Статистически значимые (p<0,05)ассоциации удалось выявить при сопоставлении пациентов из группы 1 и гистологических типов опухоли, причем для данной группы характерно преобладание прогностически наименее благоприятных типов – смешанноклеточного и эпителиодноклеточного (77,8%). Анализ ассоциаций гистологических типов УМ с опухолями из групп 2, 3 и 4 не выявил значимых отличий между различными типами УМ. В группе 4 отмечалось преобладание веретеноклеточного типа УМ (более 65%), что может косвенно свидетельствовать об относительно благоприятном течении процесса, при ЭТОМ значения статистически значимы (p<0,05). При этом необходимо отметить, что несмотря на отсутствие молекулярно-генетических изменений в сравнения группе частота эпителиоидноклеточных И смешанноклеточных типов УМ составила 34,5%. Распределение гистологических типов УМ во всех группах представлено на рисунке 14.

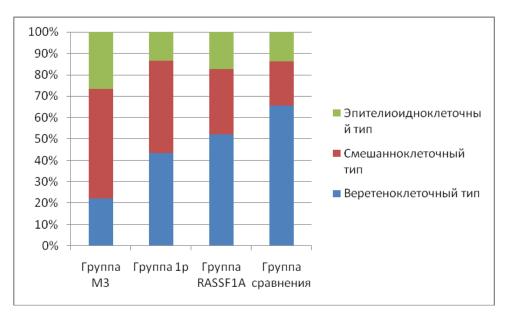


Рисунок 14. Распределение гистологических типов УМ в группах.

Также в группе 1 была выявлена ассоциация с вовлечением опухолевый процесс, цилиарного тела что традиционно расценивается как неблагоприятный фактор, ухудшающий витальный прогноз [144]. Так, в данной группе мы наблюдали больше половины (51,1%)пациентов cцилиохориоидальной иридоцилиохориоидальной локализацией УМ, при этом ассоциация была статистически значима (p=0.038). Данное отличие представляется значимым по сравнению с группами 2, 3, 4, а также общей когортой пациентов, где преобладали новообразования хориоидальной локализации без вовлечения цилиарного тела (см. рис. 15). Так, в группах 3 и 4 количество образований с вовлечением цилиарного тела составило немногим более 20% (21,7% и 20,7%, соответственно), что также косвенно может свидетельствовать об относительно благоприятном течении процесса.

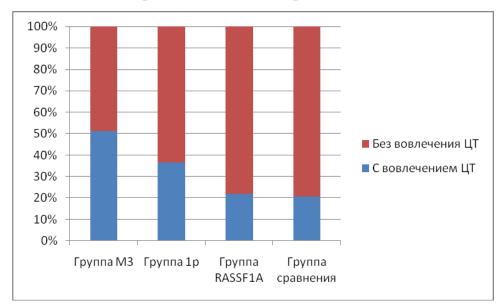


Рисунок 15. Вовлечение в опухолевый процесс цилиарного тела в различных группах.

В группе пациентов с делецией всего короткого плеча хромосомы 1 (группа 2) была выявлена значимая ассоциация с

наиболее экстрабульбарным ростом опухоли, ОДНИМ ИЗ неблагоприятных факторов, увеличивающих вероятность развития метастатической болезни. Частота данного признака в группе 2 была максимальной по сравнению с другими группами и составила 16,7% (см. рис. 16). При анализе пациентов, имевших как моносомию хромосомы 3, так и потерю гетерозиготности 1p (n=14), частота экстрабульбарного роста опухоли была еще выше и составила 21,4% (n=3). В подгруппе пациентов с моносомией хромосомы 3 и метилированием гена RASSF1A частота экстрабульбарного роста составила 16,7% (n=1), а в подгруппе пациентов с метилированием гена RASSF1A и делецией всего короткого плеча хромосомы 1-22,2%(n=2). Среди двух пациентов, имеющих все три молекулярногенетические аберрации, у одного отмечался также экстрабульбарный рост УМ. Таким образом, можно предположить, что сочетание двух и более хромосомных аномалий в одной опухоли относится к неблагоприятным факторам, ухудшающим витальный прогноз.

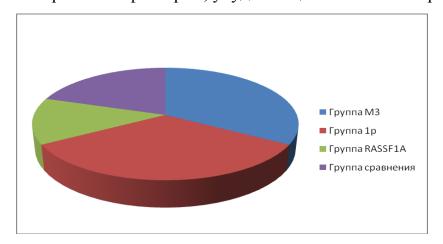


Рисунок 16. Наличие экстрабульбарного роста в зависимости от молекулярно-генетических изменений.

Отдельный интерес представляет наличие пигментации в УМ в группе сравнения. Частота пигментированных опухолей в этой группе

существенно ниже, чем в других и в общей когорте (65,5%; p<0.05), в то время как частота беспигментных опухолей составляет 34,5% (см. рис. 17).

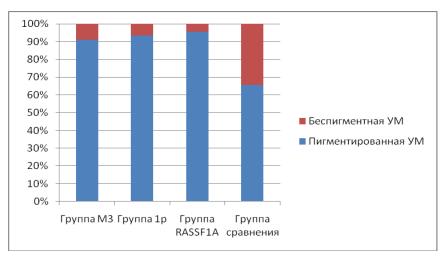


Рисунок 17. Наличие пигментации опухоли в зависимости от молекулярно-генетических изменений.

Таким образом, нами убедительно показана ассоциация потери одной копии хромосомы 3 с неблагоприятными клеточными типами УМ, а также цилиохориоидальной локализацией опухоли, согласуется с данными литературы [39]. Отмечено, что делеции в отдельных локусах короткого плеча хромосомы 3 возникают и при других внутриглазных онкологических заболеваниях, например при шванноме [22, 137]. Несмотря на это моносомия хромосомы 3 традиционно рассматривается как патогномоничная молекулярноаберрация для увеальной меланомы. Отсутствие генетическая пигмента в УМ зачастую рассматривается как неблагоприятный прогностический фактор [24, 82]. При этом ряд исследователей отмечают, вероятно, плохой витальный прогноз что, беспигментных УМ связан с поздней диагностикой таких образований [3]. В нашем исследовании частота беспигментных опухолей в группе сравнения была выше, чем в опытных группах.

Таблица 5. Клинико-морфологические характеристики пациентов, вовлеченных в исследование

	Группа М3 (n=45)	Группа 1р (n=30)	Группа RASSF1A (n=23)	Группа сравнения (n=29)	Все опухоли (n=104)
Возраст на момент операции (годы)	55±9,8	53±9,2	57±10,1	53±8,9	53±8,7
Мужчины	18 (40%)	10 (33,3%)	10 (43,5%)	6 (20,7%)	38 (36,5%)
Женщины	27 (60%)	20 (66,7%)	13 (56,5%)	23 (79,3%)	66 (63,5%)
С вовлечением ЦТ Без вовлечения ЦТ	23 (51,1%)* 22 (48,9%)*	11 (36,7%) 19 (63,3%)	5 (21,7%) 18 (78,3%)	6 (20,7%) 23 (79,3%)	37 (35,6%) 67 (64,4%)
Пигментированная Беспигментная	41 (91,1%) 4 (8,9%)	28 (93,3%) 2 (6,7%)	22 (95,6%) 1 (4,4%)	19 (65,5%)* 10 (34,5%)*	88 (84,6%) 16 (15,4%)
Гемофтальм	8 (17,8%)	13 (43,3%)	8 (34,8%)	11 (37,9%)	32 (30,8%)
Отслойка сетчатки	28 (62,2%)	19 (63,3%)	16 (69,5%)	21 (72,4%)	74 (71,1%)
Субретинальный экссудат	8 (17,8%)	9 (30%)	6 (26,1%)	5 (17,2%)	23 (22,1%)
Видимые собственные сосуды	23 (51,1%)	17 (56,7%)	11 (47,8%)	15 (51,7%)	57 (54,8%)
Экстрабульбарный рост	5 (11,1%)	5 (16,7%)*	2 (8,7%)	3 (10,3%)	11 (10,6%)
Отягощенный семейный анамнез по онкопатологии	9 (20%)	5 (16,7%)	4 (17,4%)	7 (24,1%)	19 (18,3%)
Высота опухоли (мм)	9,6±2,7	9,3±2,4	8,8±2,1	9,1±2,2	9,3±2,7
Диаметр основания опухоли (мм)	16,3±3,7	16,4±3,9	15,8±3,5	15,1±3,2	15,7±3,6
Веретеноклеточный тип	10 (22,2%)*	13 (43,3%)	12 (52,1%)	19 (65,5%)*	45 (43,2%)
Смешанноклеточный тип	23 (51,1%)*	13 (43,3%)	7 (30,4%)	6 (20,7%)*	37 (35,6%)
Эпителиоидноклет. тип	12 (26,7%)*	4 (13,4%)	4 (17,4%)	4 (13,8%)*	22 (21,2%)

<sup>\*</sup>отмеченные жирным шрифтом ассоциации статистически значимы (p<0.05)

# 3.2. Выживаемость больных УМ в зависимости от молекулярно-

При анализе общей пятилетней выживаемости пациентов (n=104) смертность составила 30,8% (n=32), при этом учитывалась только смертность от метастатической болезни (см. график 1). Живые на момент исследования (n=65, 62,5%) и умершие по другим причинам (n=7, 6,7%) составили 69,2% от общего количества пациентов в исследуемой группе. Средний срок наблюдения в общей группе пациентов составил  $60,1\pm9,3$  месяца, при этом продолжительность ОТ ликвидационного средняя жизни пациентов хирургического лечения до гибели вследствие метастатической болезни – 62,9±10,1 месяца. Следует отметить, что в исследование вошли пациенты с «большими» УМ (средняя высота опухоли – 9,3±2,7 мм, диаметр основания – 15,7±3,6 мм). Таким образом, наши данные по общей выживаемости согласуются с данными других авторов, изучавших данный вопрос [30].

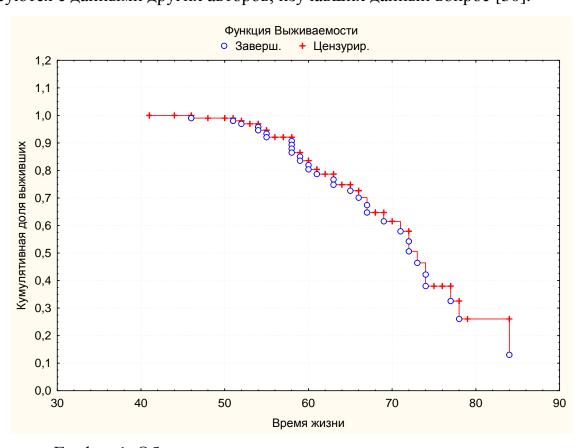


График 1. Общая онкологическая выживаемость пациентов.

Отдельный интерес представляло изучение кумулятивной доли выживших в группе 1 (n=47) по сравнению с группой без потери одной копии хромосомы 3 (n=57) (см. график 2). Анализ полученных данных показал, что в группе 1 смертность от метастатической болезни превысила выживаемость (53,2% против 46,8%, p=0,0005), что свидетельствует о значимой роли моносомии хромосомы 3 в выживаемости пациентов с УМ. Аналогичные данные приводят зарубежные авторы [31, 133, 149]. В группе без МЗ выживаемость составила 87,7%, а смертность – 12,3%, что более чем в 4 раза ниже, чем в группе 1. Таким образом, нами подтверждена ассоциация моносомии хромосомы 3 со сниженной выживаемостью при УМ.

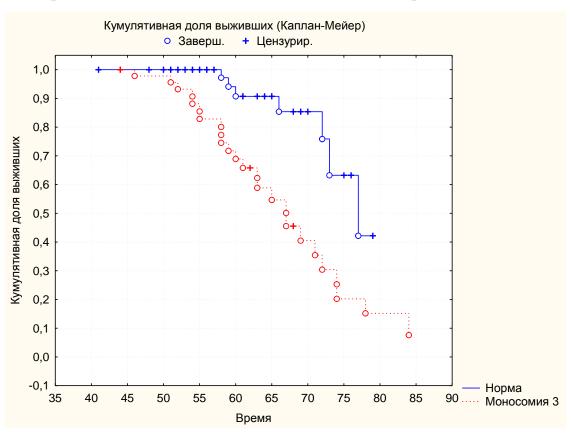


График 2. Ассоциация выживаемости пациентов со статусом

хромосомы 3

При анализе выживаемости в группах с делецией всего короткого плеча хромосомы 1 (группа 2) (n=30) в сравнении с группой без делецией всего короткого плеча хромосомы 1 (n=74) смертность составила 36,7% и 28,4%, соответственно (см. График 3). Различия в выживаемости в двух подгруппах не были статистически значимыми (p=0.064).

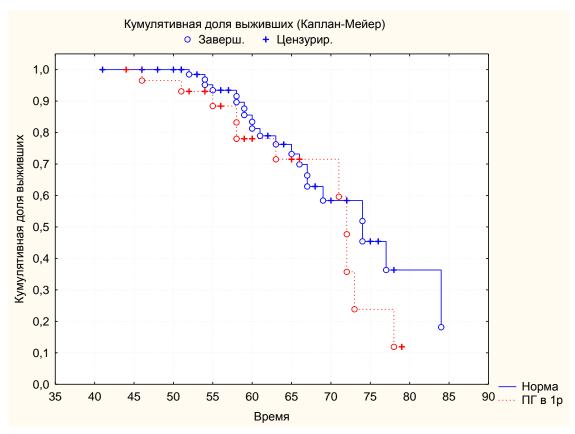


График 3. Ассоциация выживаемости пациентов со статусом хромосомы 1

Схожие данные получены при сопоставлении пациентов из группы с метилированием *RASSF1A* (группа 3) (n=23) и группы без метилирования (n=81) (смертность 26,1% и 32,1%, соответственно; см. График 4). Однако следует отметить, что в отличие от группы 2 данные различия были статистически значимыми (p=0,037 по регрессионной модели Кокса), что может свидетельствует о более благоприятном характере течения опухолевого процесса в новообразованиях с метилированием гена *RASSF1A*. Таким образом, делеция всего короткого плеча хромосомы 1 не оказывала

существенного влияния на выживаемость пациентов с УМ, а метилирование гена *RASSF1A* отмечалось при несколько лучшем витальном прогнозе.

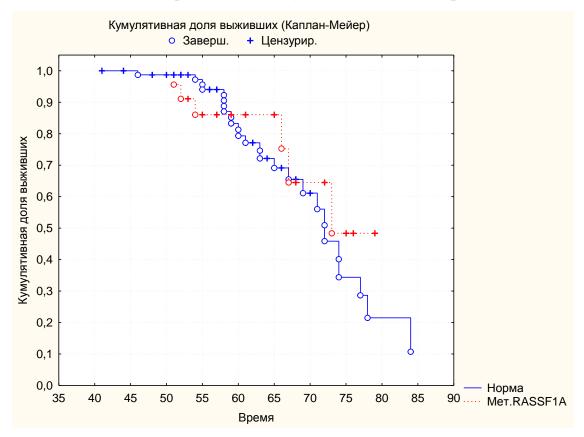


График 4. Ассоциация выживаемости пациентов с метилированием гена *RASSF1A* 

В группе пациентов с сочетанием моносомии хромосомы 3 и делеции всего короткого плеча хромосомы 1 (n=12) смертность составила 75%, что значительно превышает общую онкологическую смертность (p=0.001). При сочетании моносомии хромосомы 3 и метилирования гена *RASSF1A* (n=6) мы выявляли смертность в двух третях случаев, то есть 67% (p=0.03), а при сочетании делеции всего короткого плеча хромосомы 1 и метилирования гена *RASSF1A* (n=9) — в 22,2% случаев (p=0.068). Из двух пациентов, имевших все три молекулярно-генетические аберрации, один умер от метастатической болезни через 51 месяц после проведенного лечения.

Нами был также проведен анализ выживаемости в группе пациентов с наличием хотя бы одной из исследуемых молекулярно-генетических аберраций (n=75), по сравнению с группой пациентов без молекулярно-

генетических изменений (n=29) (см. график 5). В группе пациентов с наличием молекулярно-генетических изменений выживаемость составила 62,7%, что несколько ниже, чем в общей когорте пациентов (69,2%). При этом в контрольной группе выживаемость была существенно выше и составила 86,2% (p=0,057), что может быть обусловлено как отсутствием вышеупомянутых молекулярно-генетических аберраций, так И преобладанием более благоприятных (65,5% клеточных ТИПОВ веретеноклеточных опухолей). Подробная сравнительная оценка в группах УМ с высоким и низким риском метастазирования приведена в главе 3.3.

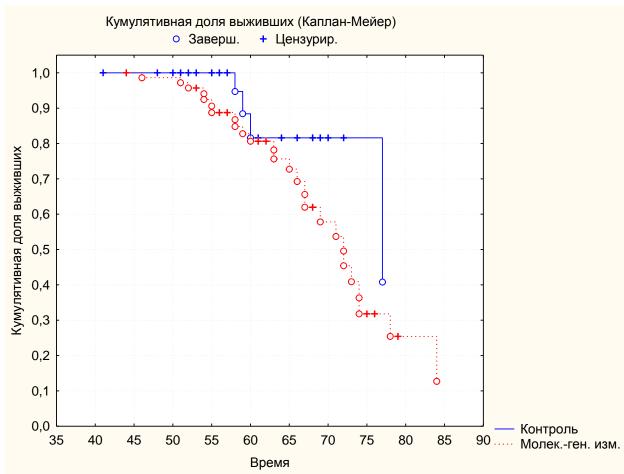


График 5. Влияние исследуемых молекулярно-генетических изменений на выживаемость по сравнению с контрольной группой.

При построении модели Кокса мы рассматривали влияние моносомии хромосомы 3, делеции всего короткого плеча хромосомы 1, метилирования гена *RASSF1A*, а также отсутствие любого из вышеупомянутых изменений на выживаемость (см. табл. 8).

Таблица 8. Модель Кокса для оценки выживаемости в различных группах.

	Бета	Станд.	t-знач.	Экспон.	Вальда	р
Группа 1	2,63815	0,759308	3,47442	13,98738	12,07160	0,000513*
Группа 2	0,74855	0,404218	1,85185	2,11394	3,42936	0,064056
Группа 3	-1,20183	0,576599	-2,08435	0,30064	4,34451	0,037136*
Группа 4	-0,61814	0,324739	-1,90350	0,53895	3,62330	0,056985*

(Бета - коэффициент регрессии, t -значение- критерий Стьюдента (значимости), Экспон. Бета - относительный риск, связанный с изменением фактора на n единиц, Вальда Статист.-значение критерия Вальда для оценки коэффициента, p- вероятность ошибки)

Наиболее значимый вклад в выживаемость (t=3,47; p=0,0005) вносит наличие потери одной копии хромосомы 3. Наличие делеции всего короткого плеча хромосомы 1 не оказывает статистически значимого влияния на выживаемость. Метилирование гена *RASSF1A* значимо увеличивает выживаемость пациентов с УМ (t=-2,08; p=0,037). Отсутствие исследуемых молекулярно-генетических изменений также значимо улучшает прогноз (t=-1,9; p=0,057).

Таким образом, нами определены 2 молекулярно-генетических фактора, влияющих на витальный прогноз (отрицательно — потеря одной копии хромосомы 3, положительно — метилирование гена *RASSF1A*), а также показано, что отсутствие молекулярно-генетических изменений в опухоли определяется при лучшем витальном прогнозе.

<sup>\*</sup> жирным шрифтом обозначены статистически значимые различия

#### 3.3. Клинические, патоморфологические и молекулярногенетические особенности УМ с высоким риском метастазирования

Для выявления особенностей УМ у пациентов с метастатической болезнью по сравнению с группой без метастатической болезни был проведен анализ клинических, патогистологических и молекулярногенетических характеристик (в ткани опухоли). Пациенты, умершие в результате метастатической болезни, составили 30,8% (n=32) от общего количества больных; пациенты, живые на момент исследования или умершие по другим причинам составили 69,2% (n=72). Сопоставление клинических, патогистологических и молекулярно-генетических характеристик данной группы пациентов (Группа А) и группы пациентов без метастазов или умерших по другим причинам (Группа Б) приведено в таблице 9.

Таблица 9. Клинические, патоморфологические и молекулярногенетические особенности УМ с высоким риском метастазирования.

	Группа A (n=32)	Группа Б (n=72)
Возраст на момент операции (годы)	56±9,4	52±8,8
Мужчины	12 (37,5%)	26 (36,1%)
Женщины С вовлечением ЦТ	20 (62,5%) 14 (43,8%)*	46 (63,9%) 22 (30,6%)*
Без вовлечения ЦТ	18 (56,2%)*	50 (69,4%)*
Пигментированная	28 (87,5%)	60 (83,3%)
Беспигментная	4 (12,5%)	12 (16,7%)
Гемофтальм	10 (31,2%)	22 (30,6%)
Отслойка сетчатки	18 (56,2%)	53 (73,6%)
Субретинальный экссудат	7 (21,9%)	13 (18,1%)
Видимые собственные сосуды	16 (50%)	38 (52,8%)
Экстрабульбарный рост	4 (12,5%)	7 (9,7%)
Отягощенный семейный анамнез по онкопатологии	10 (31,2%)*	9 (12,5%)*
Высота опухоли (мм)	9,2±2,4	9,5±2,6

Диаметр основания опухоли (мм)	15,6±3,3	16±3,6
Веретеноклеточный тип	11 (34,3%)*	34 (47,2%)*
Смешанноклеточный тип	14 (43,8%)*	23 (32%)*
Эпителиоидноклеточный тип	7 (21,9%)*	15 (20,8%)*
Потеря одной копии хромосомы 3	25 (78,1%)*	20 (27,8%)*
Делеция всего короткого плеча хромосомы 1p	11 (34,3%)	19 (26,4%)
Метилирование <i>RASSF1A</i>	6 (18,8%)*	17(23,6%)*
Отсутствие исследуемых молекулярно-генетических изменений	4 (12,5%)*	25 (34,7%)*

<sup>\*</sup>Отмеченные различия статистически значимы (p<0,05)

Средний возраст в группе А составил 56±9,4 лет, а в группе 2 – 52±8,8 года. Распределение по полу и возрасту в двух группах было приблизительно одинаковым. Также мы не обнаружили статистически значимых отличий между группами по таким параметрам, как высота и диаметр основания опухоли. Необходимо отметить, что в исследование вошли пациенты с «большими» УМ и соответствующими показаниями для проведения энуклеации. Таким образом, в данном исследовании не представляется возможным оценить роль размеров УМ как прогностического фактора в связи с относительной однородностью выборки.

Статистически значимые различия между группами выявлены в распределении патогистологических типов опухоли (см. рис. 18). Так, в группе А количество веретеноклеточных типов УМ, характеризующихся наиболее благоприятным течением опухолевого процесса, было на 12,9% меньше чем в группе Б и составило 34,3%. В то же время количество пациентов с неблагоприятными типами УМ (смешанноклеточного и эпителиоидноклеточного) в группе А составило около 2/3 (65,7%) от общего количества пациентов в группе. При этом следует отметить, что процент эпителиоидноклеточных УМ в обеих группе А и Б отличался незначительно и составил 21,9% и 20,8%, соответственно.

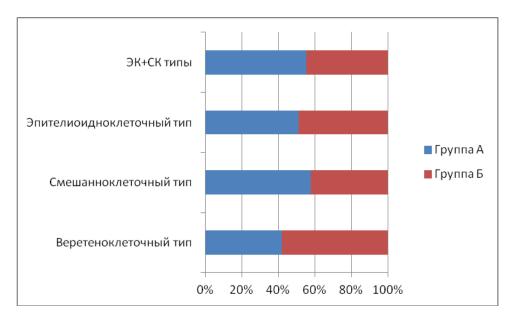


Рисунок 18. Распределение патогистологических типов УМ в группах А и Б.

В группе А процент УМ с вовлечением в опухолевый процесс цилиарного тела (цилиохориоидальной и иридоцилиохориоидальной локализации) был значимо выше, чем в группе Б (43,8% против 30,6%, см. рис. 19).

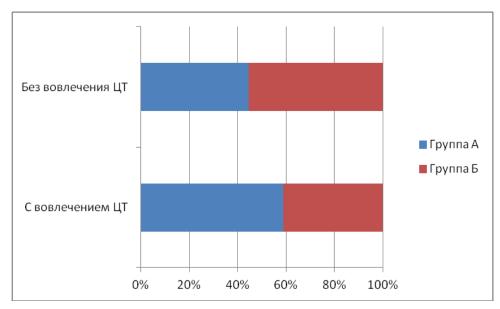


Рисунок 19. Распределение УМ по локализации в группах А и Б.

При сопоставлении двух групп по таким клиническим признакам, как наличие пигментации, гемофтальма, вторичной отслойки сетчатки, субретинального экссудата и видимых собственных сосудов нами не были

выявлены статистически значимые различия. Необходимо отметить, что разница между группой А и группой Б по наличию вторичной отслойки сетчатки составила 17,4% (56,2% и 73,6%, соответственно), однако данная закономерность, скорее всего, может носить случайный характер. При статистической обработке результатов оценки клинических параметров у пациентов обеих групп учитывался такой фактор, как проходимость сред глаза.

Отдельный интерес представляет ассоциация развитием метастатической болезни такого неблагоприятного фактора, как наличие экстрабульбарного роста. Статистический анализ пациентов из групп А и Б не выявил статистически значимых отличий между группами (р=0.074), однако следует отметить, что при этом частота УМ с наличием экстрабульбарного роста в группах отличалась незначительно (12,5% и 9,7%, соответственно; см. рис. 20). При более детальном анализе размеров экстрабульбарного роста показано, что в группе А из 4 случаев в 3 были выявлены большие узлы размерами до 9х7 мм, и лишь в одном – небольшие скопления клеток, в то время как в группе Б в 5 случаях из 7 обнаруживали небольшие экстрабульбарные узлы размерами до 1х2 мм.

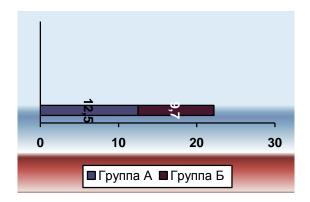


Рисунок 20. Частота УМ с экстрабульбарным ростом в группах А и Б.

При сборе анамнеза у пациентов при первичном осмотре учитывался такой фактор, как наличие онкологических заболеваний у ближайших родственников. Как правило, пациенты могли рассказать о заболеваниях у

родственников во втором или третьем поколении (родители, родные бабушки и дедушки), крайне редко в четвертом (прабабушки и прадедушки), а также у других родственников (дяди, тети, двоюродные и троюродные братья/сестры и т.д.). Подобная информация представляется достаточно субъективной, т.к. пациенты могли не знать о наличии онкологического заболевания даже у ближайших родственников (например, у одного из родителей при условии, если они проживали отдельно друг от друга с детства), а также в связи с давностью лет могли давать не совсем точную информацию о конкретной нозологической форме заболевания. Всего отягощенный семейный анамнез (у ближайших родственников) по онкопатологии был выявлен у 19 больных. После анализа имеющейся информации нами были выделены основные виды злокачественных новообразований у родственников пациентов с УМ (см. рис. 21).

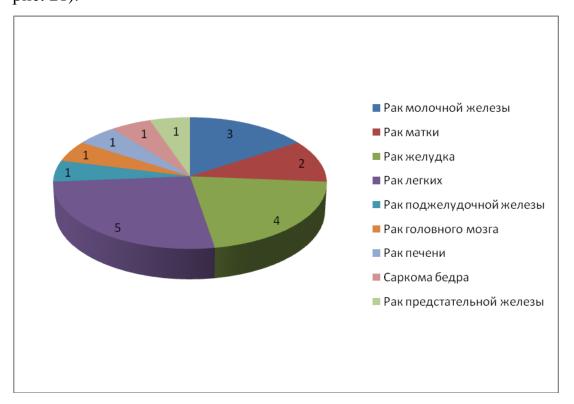


Рисунок 21. Распределение онкологических патологии у родственников пациентов с УМ по нозологическим формам.

При сопоставлении частоты отягощенного семейного анамнеза у пациентов с УМ в группах А и Б были выявлены значимые (p=0.002) отличия между группами. Так, процент отягощенного семейного онкологического

анамнеза в группе A составил 31,2%, а в группе Б - 12,5% (см. рис. 22). Данные различия могут свидетельствовать о значимости семейного фактора в развитии метастатической болезни при УМ. В литературе данный фактор остается несколько недооцененным в связи с его субъективностью.

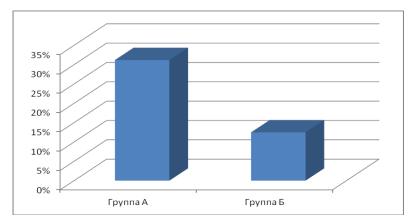


Рисунок 22. Доля отягощенного семейного онкологического анамнеза в группах A и Б.

Наибольшие различия между двумя группами получены при анализе статуса хромосомы 3. Так, процент УМ с потерей одной копии хромосомы 3 в группе А превысил таковой в группе Б практически в 3 раза (78,1% против 27,8%, см. рис. 23). Данные различия были статистически значимыми (р=0.0001). Таким образом, нами показана исключительная значимость статуса хромосомы 3 для витального прогноза при УМ.

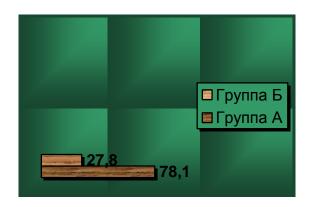


Рисунок 23. Статус хромосомы 3 в группах А и Б.

Несмотря на некоторое преобладание УМ с делеций всего короткого плеча хромосомы 1 в группе A (34,3% против 26,4%), отличия не были

статистически значимыми (p>0,05). Вместе с тем процент УМ с метилированием гена RASSF1A в группах A и Б различался и составил 18,8% и 23,6% соответственно (p=0.04), что свидетельствует о положительной роли данного фактора в развитии УМ.

Отсутствие какого-либо из исследуемых молекулярно-генетических изменений было выделено как отдельный прогностический фактор. При сопоставлении пациентов из группы A и Б были выявлены статистически значимые различия между группами (p=0.035). Так, в группе A доля пациентов с отсутствием исследуемых молекулярно-генетических изменений составил 12,5%, в то время как в группе Б - 34,7% (см. рис. 24)

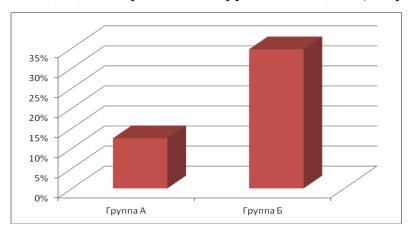


Рисунок 24. Частота УМ без исследуемых молекулярно-генетических изменений

Таким образом, можно сделать следующие предварительные выводы:

- 1) Возраст, пол пациентов, наличие пигментации, гемофтальма, вторичной отслойки сетчатки, субретинального экссудата и видимых собственных сосудов существенно не различались в группах УМ с высоким и низким риском метастазирования;
- 2) Экстрабульбарный рост УМ наблюдался с приблизительно одинаковой частотой в обеих группах, однако размеры экстрабульбарных узлов в группе с высоким риском метастазирования были существенно выше. Подавляющее большинство авторов рассматривают экстрабульбарный рост опухоли как фактор, значительно ухудшающий витальный прогноз [30, 77, 121, 150, 153];

- 3) Для пациентов с УМ с высоким риском метастазирования характерно преобладание эпителиоидноклеточного и смешанноклеточного варианта опухоли, а также более высокий процент УМ с вовлечением цилиарного тела Данный признак, как было показано в ряде исследований, относится к наиболее неблагоприятным в отношении витального прогноза [30];
- 4) Наличие потери одной копии хромосомы 3 отмечается при сильно сниженном витальном прогнозе для пациентов с УМ, что согласуется с большинством авторов;
- 5) Наличие делеции всего короткого плеча хромосомы 1 не влияет на развитие метастатической болезни при УМ, а метилирование гена *RASSF1A* соответствует несколько лучшему витальному прогнозу.

Глава 4. Результаты собственных исследований и их обсуждение.

Проспективная группа

#### 4.1. Общая клинико-морфологическая характеристика группы

Общее количество пациентов в проспективной группе составило 30 человек, из них женщин 18 (60%), а мужчин — 12 (40%). Все пациенты проходили хирургическое лечение в отделении офтальмоонкологии и радиологии МНИИ ГБ имени Гельмгольца в период с марта по декабрь 2012 г. Возраст пациентов составил 23 — 72 года (средний возраст 51,3±12 лет, см. рис. 25). Высота опухоли составила 2,6-13,8 мм (8,6±2,9 мм), диаметр основания опухоли — 8,2-21,9 мм (15±3,4 мм) (см. рис. 26 и 27). Необходимо отметить, что при юкстапапиллярной локализации УМ и ее «нависании» над ДЗН проводилась энуклеация вне зависимости от относительно небольшой высоты опухоли. Срок наблюдения составил 13-23 месяца (17,4±3,1 месяца).

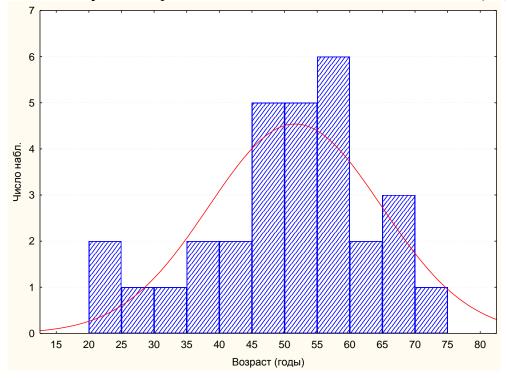


Рис. 25. Распределение пациентов по возрасту

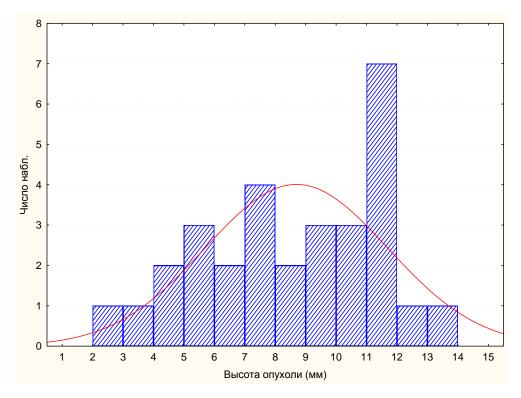


Рис. 26. Распределение пациентов по высоте опухоли.

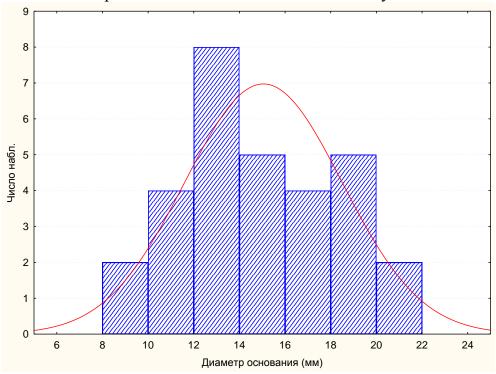


Рис. 27. Распределение пациентов по диаметру основания опухоли.

У всех 30 пациентов было проведено ликвидационное лечение (энуклеация). У 2 пациентов (6,7%) ликвидационному лечению предшествовало органосохранное.

По локализации выделяли меланому цилиохориоидальной зоны -5 пациентов (16,7%), хориоидеи -22 пациента (73,3%) и иридоцилиохориоидальной зоны -3 пациента (10%) (см. рис. 28).



Рисунок 28. Распределение пациентов проспективной группы по локализации опухолевого процесса.

Анализ клинических характеристик УМ проводили по таким параметрам, как пигментация опухоли, наличие гемофтальма, отслойки сетчатки, субретинального экссудата, видимых собственных сосудов и эпибульбарного роста опухоли. Также учитывался семейный анамнез (наличие онкологической патологии у родственников). Подробная клиническая характеристика пациентов собственной группы приведена в таблице 10.

Таблица 10. Клиническая характеристика пациентов проспективной

группы.

Параметр	Частота		
Пигментация опухоли			
Выраженная	13 (43,3%)		
Умеренная	14 (46,7%)		
Беспигментная	3 (10%)		
Гемофтальм			

Есть	4 (13,3%)
Нет	26 (86,7%)
Отслойка сетчатки	
Невысокая	12 (40%)
Высокая	11 (36,7%)
Нет	7 (23,3%)
Субретинальный экссудат	
Есть	14 (46,7%)
Нет	16 (53,3%)
Видимые собственные сосуды	
Есть	14 (46,7%)
Нет	7 (23,3%)
Помутнение сред	9 (30%)
Экстрабульбарный рост	
Есть	5 (16,7%)
Нет	25 (83,3%)
Отягощенный семейный анамнез (	
у родственников во втором и	
третьем поколении)	
Есть	11 (36,7%)
Нет	19 (63,3%)

По патогистологическому типу УМ выделяли опухоли веретеноклеточного (n=16; 53,3%), смешанноклеточного (n=9; 30%) и эпителиоидноклеточного (n=5; 16,7%) (см. рис. 29).

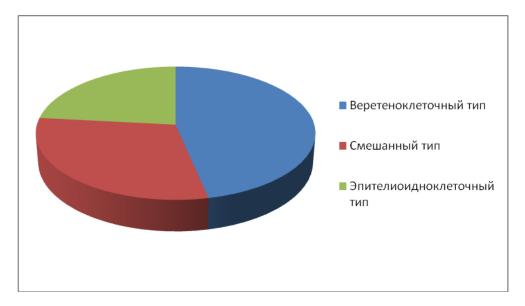


Рисунок 29. Распределение УМ по гистологическим типам в проспективной группе.

В каждом из исследуемых случаев проводилась также ультразвуковое дуплексное сканирование опухоли непосредственно перед хирургическим вмешательством, при этом оценивалась ультразвуковая плотность различных частей опухоли, выраженная в условных единицах. Так, значения  $A_1$  (основание опухоли) составили от 28 до 122 единиц (64,1±7,4),  $A_2$  (середина опухоли) от 10 до 129 единиц (70,3±8,1) и  $A_3$  (вершина опухоли) – от 54 до 131 единицы (93,9±10,2), а также среднее значение акустической плотности ( $A_{cp}$ ) – от 38,3 до 117,3 единиц (76,1±8,8; см. рис. 30).

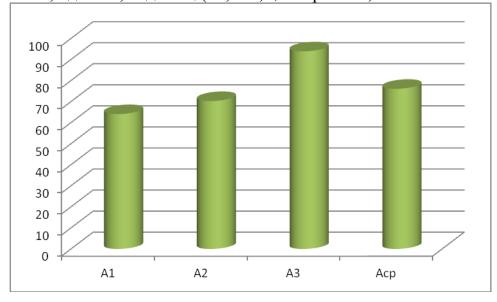


Рисунок 30. Значения акустической плотности у пациентов проспективной группы.

Всем пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование как в периферической крови, так и в клетках опухоли, всего включавшее помимо определения потери одной копии хромосомы 3, делеции всего короткого плеча хромосомы 1 и метилирования гена *RASSF1A* также анализ частичной моносомии хромосомы 3, потери одной копии хромосомы 8 и делеции всего короткого плеча хромосомы 8, метилирования гена *SEMA3B*, мутаций в экзонах 4 и 5 онкогенов *GNAQ* и *GNA11*, а также мутаций в гена *ABCB1/MDR1*. Подробный анализ полученных данных приведен в главах 4.2-4.5.

# 4.2. Ассоциация клинико-морфологических характеристик со статусом хромосом 3, 1 и 8

На основании проведенного молекулярно-генетического исследования и изучения численных и структурных изменений хромосом все пациенты разделены на 4 группы: Іа группа — пациенты с потерей одной копии хромосомы 3 (моносомией хромосомы 3) (n=5; 16,7%), Па группа — пациенты с делециями в различных сегментах хромосомы 3 (n=20; 66,7%), Па группа — пациенты с делецией всего короткого плеча хромосомы 1 (потерей гетерозиготности в хромосоме 1р) (n=9; 30%), ІVа группа — пациенты с делецией всего короткого плеча хромосомы 8 (n=6; 20%), а также группа сравнения (Va), которую составили пациенты без исследуемых аномалий (n=4; 13,3%). Также для каждой из групп выделена собственная подгруппа сравнения, в которую вошли пациенты с УМ без конкретной хромосомной аберрации. Клинико-морфологическая характеристика каждой из групп приведена в таблице 11.

При анализе полученных данных с использованием U-критерия Манна-Уитни выявлена статистически значимая (p=0,035) ассоциация в

группе Ia по сравнению с другими группами между потерей одной копии хромосомы 3 и распространением опухоли на цилиарное тело, при этом учитывались образования цилиохориоидальной и иридоцилиохориоидальной

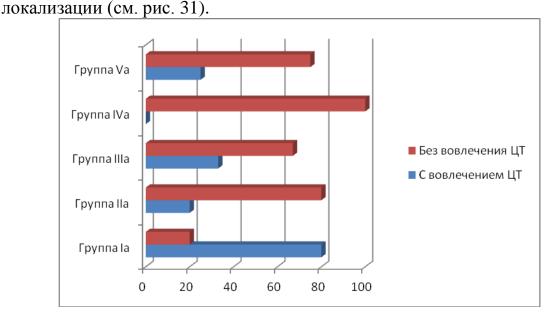


Рисунок 31. Вовлечение в опухолевый процесс цилиарного тела в зависимости от хромосомной аберрации.

Данные различия могут свидетельствовать о значимости вовлечения в процесс цилиарного тела как отрицательного прогностического фактора. Следует отметить, что данные в проспективной группе исследований соответствуют таковым в ретроспективной группе. Таким образом, нами убедительно показана ассоциация цилиарной локализации опухоли с наличием моносомии хромосомы 3 и плохим витальным прогнозом (см. главу 3.3).

Отдельный интерес представляет изучение группы так называемых частичных моносомий хромосомы 3. При определении подобных мутаций нами не была обнаружена полная моносомия, а лишь частичная моносомия в локусах 21.31 и 25.1 короткого плеча хромосомы 3. Тем не менее, данные изменения большинством исследователей характеризуются как неблагоприятные, выражено снижающие выживаемость пациентов метастатической УМ [31]. При сопоставлении имеющихся частичных моносомий у пациентов из группы На с клинико-морфологическими характеристиками была выявлена статистически значимая ассоциация частичной моносомии хромосомы 3 с прогностически наиболее неблагоприятными типами опухоли, смешанноклеточным и эпителиоидноклеточным (55% против 30% в группе сравнения и 47% в общей когорте пациентов; p=0,014 и 0,042, соответственно; см. рисунок 32).

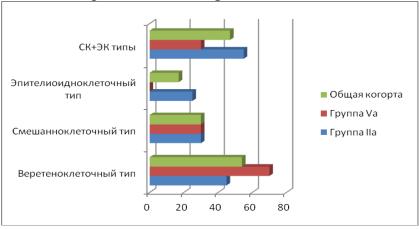


Рисунок 32. Взаимосвязь клеточных типов УМ и наличия частичной моносомии хромосомы 3.

Также в группе Па была выявлена значимая ассоциация (p=0,044) с высокой акустической плотностью в вершине опухоли, что также принято считать относительно неблагоприятным прогностическим фактором (см. рис. 33), при этом взаимосвязи с показателями акустической плотности в других отделах опухоли, а также со средними значениями ( $A_{cp}$ ) выявить не удалось.

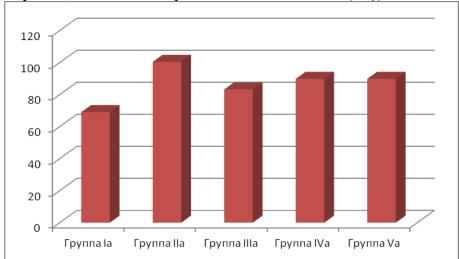


Рисунок 33. Значение акустической плотности в области вершины опухоли в зависимости от хромосомной аберрации.

Другие статистически значимые различия в группах по исследуемых признакам выявлены не были. Таким образом, нами показана значимая ассоциация полной моносомии хромосомы 3 с вовлечением в процесс цилиарного тела, а частичной моносомии в локусах 21.31 и 25.1 короткого плеча хросомомы 3 — с наиболее неблагоприятными клеточными типами опухоли и повышенной акустической плотностью в области вершины опухоли, что свидетельствует о неблагоприятном характере данных изменений при УМ.

Таблица 11. Клинико-морфологические характеристики пациентов с хромосомными аберрациями.

	Группа Ia (n=5)	Группа IIa (n=20)	Группа IIIa (n=9)	Группа IVa (n=6)	Группа Va (n=4)
Возраст на момент операции (годы)	59±9,2	48±7,9	54±8,3	44±6,2	55±8,8
Мужчины	0	8 (40%)	2 (22,2%)	1 (16,7%)	3 (75%)
Женщины	5 (100%)	12 (60%)	7 (77,8%)	5 (83,3%)	1 (25%)
С вовлечением ЦТ	4 (80%)*	4 (20%)	3 (33,3%)	0	1 (25%)
Без вовлечения ЦТ	1 (20%)*	16 (80%)	6 (66,7%)	6 (100%)	3 (75%)
Пигментированная	5 (100%)	17 (85%)	8 (88,9%)	6 (100%)	4 (100%)
Беспигментная	0	3 (15%)	1 (11,1%)	0	0
Гемофтальм	0	3 (15%)	1 (11,1%)	1 (16,7%)	1 (25%)
Отслойка сетчатки	4 (80%)	16 (80%)	8 (88,9%)	5 (83,3%)	2 (50%)
Субретинальный экссудат	4 (80%)	9 (45%)	2 (22,2%)	0	1 (25%)
Видимые собственные сосуды	4 (80%)	9 (80%)	1 (11,1%)	3 (50%)	1 (25%)
Экстрабульбарный рост	1 (20%)	4 (20%)	2 (22,2%)	1 (16,7%)	0
Акустическая плотность (у.е.)					
А <sub>1</sub> (основание)	$87,7\pm15,1$	62,4±12,1	$64,7\pm13,3$	58,5±10,9	61±11,8
А2 (середина)	$72,3\pm13,8$	71,9±13	$64,3\pm13,1$	55,7±10,4	77±14,2
А3 (вершина)	$69\pm13,5$	100,4±17,6*	$83,2\pm15$	89,8±15,6	89,8±16,1
$A_{cp}$	$76,3\pm14,5$	78,2±14,9	$70,7\pm12,7$	68±11,7	75,9±13,8
Отягощенный семейный анамнез по	3 (60%)	7 (35%)	2 (22,2%)	2 (33,3%)	1 (25%)
онкопатологии					
Высота опухоли (мм)	8,4±1,9	8,6±2	8,1±1,7	9,4±2,5	8,5±1,9
Диаметр основания (мм)	14,8±3,6	14,8±3,5	14,7±3,2	13,1±3	15,8±4,1
Веретеноклеточный тип	3 (60%)	9 (45%)*	5 (55,6%)	3 (50%)	3 (75%)
Смешанноклеточный тип	2 (40%)	6 (30%)*	3 (33,3%)	1 (16,7%)	1 (25%)
Эпителиоидноклеточный тип	0	5 (25%)*	1 (11,1%)	2 (33,3%)	0

<sup>\*</sup>отмеченные жирным шрифтом ассоциации статистически значимы (p<0,05)

# 4.3. Взаимосвязь клинико-морфологических характеристик УМ с метилированием генов *RASSF1A* и *SEMA3B*

Нами был проведен анализ метилирования гена *SEMA3B* в ткани опухоли, ингибирующего процесс апоптоза при раке легкого и желудка, способствуя тем самым росту и делению опухолевых клеток [47]. Имеются отдельные свидетельства о роли данного гена в развитии увеальной меланомы [98]. В нашей работе ни в одном из полученных образцов (n=30) не удалось выявить метилирование гена *SEMA3B*. Таким образом, значение данного гена в развитии и прогрессировании УМ убедительно не показано.

При проведении анализа метилирования гена *RASSF1A* данные в собственной и архивной группе пациентов были объединены. Частота данного изменения составила 23,9% (n=32). На основании полученных данных нами были выделены 2 группы: с наличием метилирования гена *RASSF1A*, и Пб группа — без метилирования. Подробный анализ клиникоморфологических характеристик каждой из групп приведен в таблице 12.

Таблица 12. Клинико-морфологические особенности пациентов с метилированием гена *RASSF1A*.

	Группа с метилированием <i>RASSF1A</i> (n=32)	Группа без метилирования <i>RASSF1A</i> (n=102)
Возраст на момент операции		
(годы)	54,3±8,1	50±7,6
Мужчины	12 (37,5%)	37 (36,2%)
Женщины	20 (62,5%)	65 (63,8%)
С вовлечением ЦТ	7 (21,9%)	38 (37,2%)
Без вовлечения ЦТ	25 (78,1%)	64 (62,8%)

Пигментированная	31 (96,9%)	85 (83,3%)
Беспигментная	1 (3,1%)	17 (16,7%)
Гемофтальм	9 (28,1%)	27 (26,5%)
Отслойка сетчатки	22 (68,7%)	75 (73,5%)
Субретинальный экссудат	11 (34,4%)	26 (25,5%)
Видимые собственные сосуды	15 (46,9%)	56 (54,9%)
Экстрабульбарный рост	2 (6,2%)	14 (13,7%)*
Акустическая плотность (у.е.)		
А <sub>1</sub> (основание)	80,5±14,4	59,2±11,8
А2 (середина)	75±13,6	68,9±12,7
А <sub>3</sub> (вершина)	80,3±14,2*	98±15,1*
$A_{cp}$	78,6±13,9	75,4±13,6
Отягощенный семейный анамнез	7 (21,9%)	23 (22,5%)
по онкопатологии		
Высота опухоли (мм)	7,4±1,4*	9,5±2,9*
Диаметр основания (мм)	15±3,8	15,2±4,1
Веретеноклеточный тип	21 (65,6%)*	43 (42,1%)*
Смешанноклеточный тип	7 (21,9%)*	37 (36,2%)*
Эпителиоидноклеточный тип	4 (12,5%)*	23 (22,5%)*

<sup>\*</sup>отмеченные жирным шрифтом ассоциации статистически значимы (p<0,05)

Статистически значимое снижение высоты опухоли в группе с метилированием RASSF1A по сравнению с группой без метилирования (p=0,039) может свидетельствовать о положительном влиянии метилирования гена RASSF1A на течение опухолевого процесса при увеальной меланоме (см. рис. 34). Так, средняя высота опухоли в группе RASSF1A составила всего 7,4 $\pm$ 1,4 мм по сравнению с 9,5 $\pm$ 2,9 мм в группе без метилирования.

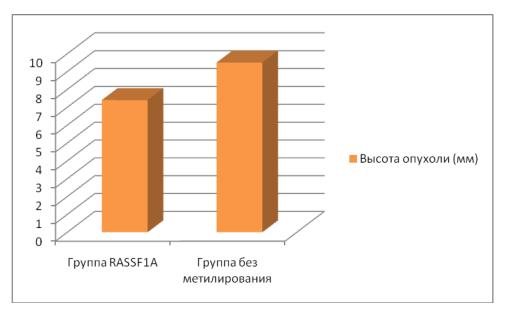


Рисунок 34. Различия в высоте опухоли в зависимости от наличия метилирования гена *RASSF1A*.

Значимые отличия получены также по таким важным параметрам, как гистологический тип опухоли (см. рис. 35). Так, в группе с метилированием гена *RASSF1A* преобладали опухоли веретеноклеточного типа (65,6%), при этом доля эпителиоидноклеточных опухолей была значимо ниже, чем в группе без метилирования *RASSF1A* (12,5% против 22,5%, p=0,014). В группе без метилирования веретеноклеточные опухоли составили всего 42,1%, а эпителиоидноклеточные и смешанноклеточные более половины от всех случаев (58,7%), из них прогностически наименее благоприятные смешанноклеточные – 36,2% (p=0,023).

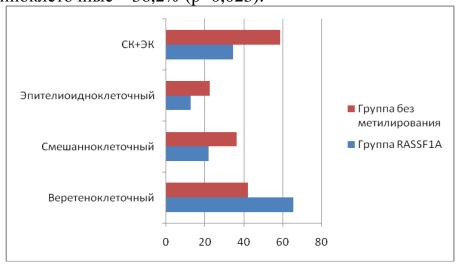


Рисунок 35. Взаимосвязь клеточных типов УМ с наличием метилирования гена *RASSF1A*.

Отдельный интерес представляют различия в таком прогностически значимом клиническом признаке, как экстрабульбарный рост опухоли. Так, в группе с метилированием *RASSF1A* мы наблюдали экстрабульбарный рост лишь в 2 случаях, что составило 6,2%. В группе без метилирования *RASSF1A* частота данного признака была в два раза выше и составила 13,7% (n=14), при этом различия были статистически значимыми (p=0,044). Данные отличия могут указывать на относительно благоприятный характер течения опухолевого процесса при наличии метилирования гена *RASSF1A* в клетках опухоли.

Акустическую плотность опухоли исследовали только в собственной группе пациентов (n=30). При сопоставлении средних значений акустической плотности по данным УЗДС в двух группах нами были выявлены статистически значимые (p=0,05) отличия лишь в А<sub>3</sub> (акустическая плотность в области вершины опухоли). Среднее значение А<sub>3</sub> в группе сравнения составило  $98\pm15,1$  у.е., в то время как в группе с метилированием RASSF1A плотность была меньше и составила 80,3±14,2 у.е. (см. рис. 36). Схожие значения были получены при сопоставлении групп при хромосомных изменениях (см. главу 4.2). Данные отличия ΜΟΓΥΤ свидетельствовать о более благоприятном характере течения УМ у пациентов с метилированием гена RASSF1A, однако убедительных данных в доступной литературе о роли акустической плотности в области верхушки опухоли в выживаемости пациентов с УМ нам получить не удалось.

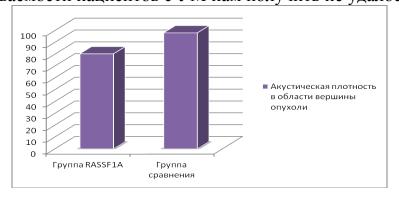


Рисунок 36. Различия в акустической плотности в области вершины опухоли в зависимости от наличия метилирования гена *RASSF1A*.

# 4.4. Влияние мутаций в онкогенах *GNAQ/GNA11* на клинические и морфологические характеристики УМ

При ПДРФ-анализе 30 препаратов УМ в лейкоцитах периферической крови мутации в генах GNAQ и GNA11 были выявлены у 27 (90%) из 30 обследованных пациентов. Как следует из данных, представленных в таблице 13, мутации в 5 экзоне (Gln209) гена GNAQ найдены у 5 пациентов (16,7%), а в 5 экзоне гена GNA11 у половины обследованных пациентов (50%). В 4 экзоне (Arg183) гена GNAQ у 12 обследованных пациентов (40%) найдены гомозиготные мутации. В 4 экзоне (Arg183) гена GNA11 мутаций не найдено. В 93% случаев (25/27) мутации глутамина в 209-м положении и аргинина в 183-м положении в генах GNAQ и GNA11 взаимоисключающие, то есть наличие одной мутации исключает наличие другой, что согласуется с данными литературы [164, 165]. Примеры анализа мутаций приведены на рисунке 37. В тоже время по литературным данным частота мутаций в 5 экзоне (Gln209) генов GNAQ и GNA11 составляет 45% и 32%, соответственно; а в 4 экзоне (Arg183) для обоих генов  $\approx 6\%$  [164, 165].

Таблица 13. Результаты исследования мутаций генов *GNAQ* и *GNA11* в УМ.

№ случая	GNAQ Arg183Gln (норма)	GNAQ Gln209Leu (норма)	GNA11 Gln209Leu (норма)
1		_	Gln/Leu
2	_	Leu/Leu	Gln/Leu
3	_	_	Gln/Leu
4	_	_	Gln/Leu
5	_	_	Gln/Leu
6		Leu/Leu	_
7	Gln/Gln	_	_
8	Gln/Gln	_	_
9	Gln/Gln	_	_
10	Gln/Gln	_	_
11	_	_	Gln/Leu

12	_	_	Gln/Leu
13	_	_	Gln/Leu
14	_	_	Gln/Leu
15	_	_	Leu/Leu
16	_	_	Leu/Leu
17	_	_	Leu/Leu
18	_	_	Gln/Leu
19	_	_	_
20	_	Gln/Leu	_
21	Gln/Gln	_	_
22	Gln/Gln	_	Gln/Leu
23	Gln/Gln	Gln/Leu	Gln/Leu
24	Gln/Gln	_	_
25	Gln/Gln	_	_
26	Gln/Gln	_	_
27	Gln/Gln	_	_
28	Gln/Gln	Leu/Leu	_
29	_	_	_
30	_	_	_
<u> </u>	1	<u> </u>	

«-» – мутаций не обнаружено.

В 3 случаях из 27 нами выявлены одновременно две мутации. В случае мутации в двух генах GNAQ (Gln209)/ GNA11 (Gln209) опухоль имела цилиохориоидальную локализацию. В другом случае при выявлении мутации GNAQ (Arg183)/ GNAQ (Gln209) опухоль В генах смешанноклеточный тип строения, у пациента присутствовал отягощенный семейный анамнез по онкологическим заболеваниям. В третьем случае, при наличии мутаций в паре GNAQ (Arg183)/ GNA11 (Gln209) опухоль располагалась в хориоидее и имела смешанноклеточный тип строения. В одном случае удалось выявить 3 мутации в генах GNAQ (Arg183)/ GNAQ (Gln209)/ GNA11 (Gln209). У данного пациента опухоль располагалась также в хориоидее и имела веретеноклеточный тип строения. Недостаточный объем данных (n=3) не позволяет говорить о дигенном характере наследования мутаций В генах GNAQи *GNA11*, необходимы дополнительные исследования.

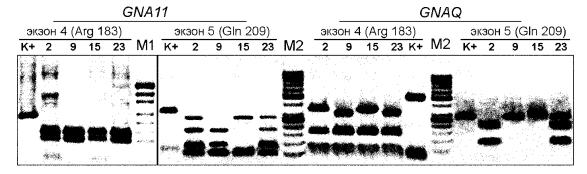


Рисунок 37. Примеры анализа мутаций в экзонах 4 и 5 генов *GNA11* и *GNAQ*. Электрофоретическое разделение в 2% агарозном геле: продуктов **ПЦР-ПДРФ** для образцов ДНК меланомы.  $\mathbf{K}$ + — образец до обработки рестриктазой,  $\mathbf{M1}$  —  $\mathbf{pUC19/MspI}$ ,  $\mathbf{M2}$  —  $\mathbf{Lad}$   $\mathbf{50}$  — маркер с шагом полос в 50 п.н.

Нами проведена оценка ассоциаций между мутациями в генах *GNAQ* и GNA11 в лейкоцитах периферической крови и такими клиническими параметрами опухоли, как локализация, размеры образования, наличие пигментации, гемофтальма, отслойки сетчатки, субретинального экссудата, собственных видимых сосудов, полей оранжевого пигмента, экстрабульбарного роста, а также с гистологическим типом опухоли и наличие отягощенного семейного анамнеза в отношении онкологической патологии у пациента. Показана статистически значимая ассоциация частоты мутации глутамина в 209-м положении гена GNAQ с высокой отслойкой сетчатки (4/11) против 1/19, p=0.0472, в то время как с другими клиническими признаками значимых связей выявлено не было.

По данным Van Raamsdonk и соавт. (2010), мутации в генах *GNAQ* и *GNA11* в Канаде наиболее часто отмечаются в УМ эпителиоидноклеточного и смешанноклеточного типа по сравнению с веретеноклеточным типом. Однако, как отмечают авторы, данная разница не носит статистически значимый характер [165]. В нашей работе частота мутации в экзоне 5 гена *GNA11* в опухоли веретеноклеточного типа в РФ в 2,8 раза выше, чем эпителиоидноклеточного типа (9/16, 56% против 1/5, 20%).

Учитывая тот факт, что веретеноклеточная УМ характеризуется более благоприятным течением, чем эпителиоидноклеточная и смешанноклеточная УМ, можно предположить, что выявление означенной мутации может свидетельствовать о более доброкачественном варианте течения УМ. Тем не менее, данный вопрос достаточно сложный и многофакторный, требующий дальнейших исследований.

По данным литературы не отмечено статистически значимых ассоциаций между мутациями в генах *GNAQ* и *GNA11* при первичной УМ и клиническими (пол, возраст, высота и диаметр основания опухоли, пигментация), цитогенетическими или молекулярными параметрами [65, 128]. Нами достоверно показано, что в 90% случаев у больных с УМ выявлены мутации в генах *GNAQ* и *GNA11*. При этом ассоциация между мутацией в экзоне 4 гена *GNAQ* и высокой отслойкой сетчатки значима, однако не носит специфического характера. Можно предположить, что выявление мутации в экзоне 5 гена *GNA11* свидетельствует об относительно доброкачественном процессе.

#### 4.5. Ассоциация мутаций в гене *ABCB1/MDR1* с риском развития УМ

Ген *MDR1/ABCB1* кодирует транспортный белок, гликопротеин Р, играющий ключевую роль в выведении целого ряда лекарственных веществ, включая препараты применяемые при лечении УМ. На сегодняшний день у человека известно около 40 сайтов гена *MDR1*. Как показали исследования, наибольшее клиническое значение имеет сайт *C3435T*, представляющий собой замену в нуклеотидной последовательности в положении 3435 цитозинового нуклеотида на тимидиновый [102]. Мутации в значимом сайте *C3435T* гена *MDR1*, локализованного в экзоне 26, обусловливают изменение

его экспрессии, что может приводить к замедленному выведению лекарственных препаратов. Пример ПДРФ-анализа аллельного состояния гена ABCB1/MDR1 в лейкоцитах периферической крови представлен на рисунке 38. Распределение частот аллелей и генотипов сайта C3435T гена ABCB1 в контрольной группе и группе больных УМ представлено в таблице 14. В 80% случаев была выявлен аллель C, что свидетельствует о высокой специфичности данного аллеля для УМ.-При этом в опытной группе аллель C встречался почти в 2 раза чаще, чем в контрольной (80% против 41,7%).

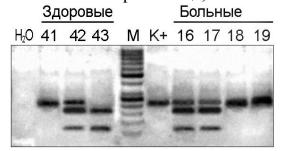


Рисунок 38. Примеры анализа сайта C3435T гена ABCB1 в 10 %-м полиакриламидном геле:  $H_2O$  - отрицательный контроль (dd вода), K+ образец до обработки рестриктазой, M- Lad 50- маркер с шагом полос в 50 п.н.

Показана значимая ассоциация предрасполагающего генотипа CC гена ABCB1 с риском развития УМ. Так, частота данного генотипа в группе больных оказалась в 4 раза выше по сравнению с группой контроля, в тоже время генотип TT у больных обнаружен не был. Ассоциация генотипа CT с риском развития УМ отмечалась в 40% случаев от общего количества аллелей C, тем не менее, данная ассоциация не была значимой (p>0,05). Таким образом, можно предположить, что наличие аллеля C является неблагоприятным фактором при развитии УМ, в то время как аллель C можно рассматривать как благоприятный фактор.

Таблица 14. Распределение частот аллелей и генотипов сайта *C3435T* 

гена АВСВ1 среди больных увеальной меланомой.

Ген	1 '		УМ	Контроль	χ2	p	OR	
			n = 30	n = 60			знач.	CI <sub>95%</sub>
	Аллель	C	0,800	0,417	23.70	1.0x10 <sup>-6</sup>	5.60	2.70 – 11.61
	1 1010100125	T	0,200	0,583	20.70	1,01110	0.18	0.09 - 0.37
ABCB1   Fei		CC	0,600	0,150	23.73		8.50	3.07 - 23.52
	Генотип	CT	0,400	0,533		$7.0 \times 10^{-6}$	0.58	0.24 - 1.42
		TT	0,000	0,317			0.03	0.00 - 0.60

<sup>\*</sup> Жирным шрифтом выделены частоты предрасполагающих аллелей и генотипа и соответствующие им значения *OR*.

Нами была проведена оценка ранговых корреляций между генотипами гена *АВСВ1* и такими параметрами опухоли, как ее локализация, высота и диаметр опухоли, наличие пигментации, гемофтальма, отслойки сетчатки, субретинального экссудата, офтальмоскопически видимых собственных сосудов, гистологического типа опухоли, наличием экстрабульбарного роста и отягощенного семейного анамнеза (см. табл. 15).

Таблица 15. Ранговые корреляции между генотипами сайта СЗ435Т

гена АВСВ1 и клинико-морфологическими параметрами УМ

	ABCB1/MDR1
Локализация	-0,097373
Высота опухоли	0,225205*
Диаметр основания опухоли	0,157180
Пигментация	-0,224037*
Гемофтальм	-0,304290
Отслойка сетчатки	0,0073801
Субретинальный экссудат	-0,149071
Видимые сосуды	0,231159*
Гистологический тип опухоли	-0,171442*
Экстрабульбарный рост	0,041703
Отягощенный семейный анамнез	-0,088889

<sup>\*</sup> Отмеченные корреляции значимы на уровне p<0,05

Корреляция частот генотипов *CT* и *CC* сайта *C3435T* гена *ABCB1* с параметрами прогрессии увеальной меланомы представлены на рис. 39.

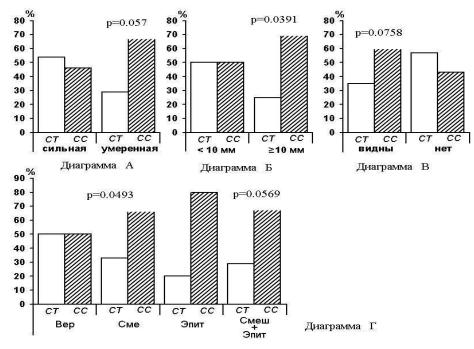


Рисунок 39. Корреляция частот генотипов CT и CC сайта C3435T гена ABCB1 с параметрами прогрессии увеальной меланомы. Диагр. А: пигментация опухоли, с сильной исследовано 13 случаев, с умеренной или отсутствием - 17; Диагр. Б: высота опухоли (<10 мм/  $\geq$ 10 мм), с <10 мм – 18 случаев, с  $\geq$ 10 мм – 12 случаев; Диагр. В: состояние сосудов, видны – 23 случая, не видны – 7 случаев; Диагр. Г: по гистологическому строению, веретеноклеточного типа – 16 случаев, смешанноклеточного – 9 случаев и эпителиоидноклеточного типа – 5 случаев.

При этом удалось выявить значимую ассоциацию генотипа CC сайта C3435T гена ABCB1 со степенью пигментации опухоли (см. диаграмму A) (при этом с выраженной пигментацией исследовано 13 случаев, а со слабой – 14, без пигментации — 3) частоты генотипов CT и CC при выраженной пигментации опухоли значительно не отличались друг от друга и составили 52% и 46%, соответственно. В случае умеренно выраженной пигментации или ее отсутствия частота генотипа CC более чем в 2 раза превосходила таковую для генотипа CT (71% (12/17) против 29% (5/17).

Анализ распределения частот генотипов CC и CT в зависимости от высоты опухоли показан на диаграмме Б. Исследованные опухоли были разделены на 2 группы — < 10 мм (n=18) и  $\geq$  10 мм (n=12). При этом частота генотипов CC и CT в первой группе была одинаковой и составила 50% (по 9 глаз в каждой подгруппе). Во второй группе мы отметили 3-х кратное увеличение частоты генотипа CC по сравнению с генотипом CT (75% и 25%, соответственно), что свидетельствует о важной роли предрасполагающего генотипа CC гена ABCB1 в прогрессии УМ.

Нами была также выявлена значимая ассоциация носительства генотипов CC и CT с наличием видимых сосудов в опухоли (n=23), что также принято считать относительно неблагоприятным прогностическим фактором (см. диаграмму В). При этом частота генотипа CC составила 65%, а генотипа CT-35%. В 7 случаях видимые собственные сосуды при офтальмоскопии не выявляли, при этом частоты генотипов CC и CT отличались незначительно и составили 42% и 58%, соответственно.

При оценке ассоциации носительства генотипов гена АВСВ1 с различными гистологическими типами опухолями, такими как прогностически благоприятный веретеноклеточный (n=16),менее благоприятный смешанноклеточный (n=9)неблагоприятный И (n=5), эпителиоидноклеточный смешанноклеточный эпителиоидноклеточный типы были объединены в одну группу (см. диаграмму  $\Gamma$ ). Частоты генотипов CC и CT при веретеноклеточном типе опухоли не различались и составили по 50% (по 8 глаз в каждой группе). В случае смешанноклеточного типа опухоли частота генотипа СТ составила 33% (n=3), тогда как частота генотипа СС была в 2 раза больше и составила 66% (n=6). При эпителиоидноклеточном типе опухоли разница была еще больше — частота генотипа СТ была 20% (n=1), а генотипа СС -80% (n=4).-В объединенной группе с эпителиоидноклеточным и смешанноклеточным типом опухоли частота генотипа CT составила 30%, а генотипа CC - 70%. Таким образом, убедительно показана неблагоприятная прогностическая значимость генотипа CC гена ABCB1 для развития УМ.

Показана возможность выявления данных мутаций в лейкоцитах периферической крови, что в перспективе можно рассматривать как возможность потенциального скрининга по УМ и ряду других патологий для пациентов, входящих в группу риска по данному заболеванию, а также прогнозирования течения заболевания [25].

Впервые изучено распределение частот генотипов сайта СЗ435Т гена *ABCB1* с риском развития УМ и их связь с клинико-патоморфологическими параметрами УМ. В настоящее время нет единого мнения относительно роли пигментации в течении опухолевого процесса при УМ, однако большая часть исследователей сходятся В мнении, ЧТО именно беспигментные малопигментированные опухоли являются прогностически наиболее неблагоприятными [150]. В связи ЭТИМ наши ΜΟΓΥΤ c данные свидетельствовать о большей злокачественности опухолей с генотипом CC.

Впервые показана статистически значимая ассоциация генотипа СС и ряда клинических (умеренная пигментация опухоли, высота опухоли и наличие видимых собственных сосудов) И патоморфологических (смешанноклеточный и эпителиоидноклеточный тип опухоли) факторов. Не выявлено взаимосвязи между генотипами гена АВСВ1 и такими факторами, как возраст пациента, локализация опухоли, диаметр основания, наличие гемофтальма, отслойки сетчатки, субретинального экссудата, экстрабульбарного роста опухоли и отягощенного семейного анамнеза. Полученные данные могут свидетельствовать о значимости генотипов сайта C3435T гена ABCB1 в развитии УМ. Наличие аллеля T гена ABCB1свидетельствует об относительно благоприятном течении опухолевого процесса. Выявленные особенности могли бы быть использованы для разработки в ходе дальнейших исследований современных подходов к прогнозированию течения УМ, а также для скрининга пациентов, находящихся в группе риска по данному заболеванию.

#### Заключение

Злокачественные внутриглазные опухоли меланоцитарного генеза, представляют угрозу не только для зрения, но и для жизни пациента. Их частота достигает 15% от общего числа меланом других локализаций, при этом частота УМ составляет 85-88% всех первичных внутриглазных злокачественных новообразований [138]. В России заболеваемость УМ колеблется от 6,23 до 8 человек на 1 млн. взрослого населения в год [3,18]. УМ характеризуется агрессивным, прогрессирующим течением, высокой вероятностью, метастазирования и летального исхода. Установлено, что через 5 лет у 50% пациентов с УМ после проведенного лечения диагностированы метастазы в печень [32, 35].

Поиску факторов прогноза течения опухолевого процесса при УМ в последние годы уделяется особое значение. Исторически первыми были изучены клинические факторы. К ним относятся пол, возраст, расовая принадлежность, иммунологический статус, общий статус больного, сопутствующие заболевания, локализация опухоли и размеры опухоли [69, 73, 95, 104]. К сожалению, в настоящее время взаимосвязь многих из вышеперечисленных факторов с УМ изучена недостаточно. чувствительными являются патоморфологические факторы. К ним можно отнести тип гистологического строения опухоли, степень инвазии склеры, прорастание за пределы фиброзной капсулы, характер и тип ангиогенеза, степень лимфоидной инфильтрации строме опухоли, В уровень пролиферативной активности клеток новообразования, размеры ядра и ядрышкового анализатора и т.д. [104, 136]. Выявление молекулярногенетических изменений при УМ представляется наиболее перспективным способом прогнозирования течения заболевания. Необходимо отметить, что поиск новых молекулярно-генетических механизмов патогенеза УМ остается одной из нерешенных задач, стоящих перед офтальмоонкологами и цитогенетиками во всем мире. На сегодняшний день накоплен большой опыт исследований цитогенетических изменений при УМ [17]. Выявление связи между наличием моносомии хромосомы 3 и плохим витальным прогнозом в 1996 г. группой ученых позволило интенсифицировать разработки в этой области [125].

Прогнозирование развития УМ остается одним из наиболее актуальных направлений в офтальмоонкологии. Молекулярный механизм развития опухоли, несмотря на достигнутые успехи, остается малоизученным. Нами была предпринята попытка установить корреляцию между основными параметрами опухоли и витальным прогнозом, а также выявить новые возможные звенья механизма онкогенеза УМ. Основными предпосылками для планирования диссертационной работы были:

- актуальность прогнозирования течения УМ как заболевания, сопровождающегося высокой смертностью;
  - недостаточное понимание молекулярного механизма онкогенеза УМ;
- возможность разработки в перспективе протоколов раннего выявления и прогнозирования развития УМ у людей в группе риска по данному заболеванию.

В связи с поставленной целью – прогнозировать течение УМ на основе анализа молекулярно-генетических изменений - были решены следующие задачи:

- 1) Установлена частота хромосомных изменений у больных УМ;
  - 2) Установлена частота генных изменений у больных УМ;
- 3) Выявлены клинико-морфологические закономерности течения опухолевого процесса у больных с УМ в соответствии с молекулярно-генетическими изменениями;
- 4) Определена общая онкологическая 5-летняя выживаемость при УМ и ее взаимосвязь с молекулярно-генетическими изменениями

(потеря одной копии хромосомы 3, делеция всего короткого плеча хромосомы 1, метилирование гена *RASSF1A*);

5) Выявлены клинические, патогистологические и молекулярно-генетические особенности УМ с высоким риском метастазирования.

В соответствии с поставленными задачами работа включала клинические, генетические и статистические методы исследования. В работе проведена комплексное клинико-инструментальное исследование у 134 пациентов с УМ, из них 131 пациенту по показаниям проведена энуклеация пораженного глаза, а 3 – блокэксцизия опухоли. Все опухоли были гистологически верифицированы. Среди генетических методов исследования применяли как широко распространенные метод метил-чувствительной полимеразной цепной реакции и метил-чувствительного рестрикционного анализа, так и менее используемый метод анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Необходимо также отметить большой объем (104 человека) полученной от больных, их родственников, а также региональных департаментов здравоохранения информации о состоянии здоровья пациентов и причине их смерти. Это позволило точно оценить влияние различных молекулярно-генетических факторов на витальный прогноз, а также определить общую онкологическую выживаемость пациентов при УМ. В ходе статистической обработки использовались как (критерий Фишера, стандартные статистические методы Пирсона, Стьюдента, отношение шансов), так и относительно специфические (метод множительных оценок Каплан-Мейера, двухвыборочный критерий Манна-Уитни, регрессионная модель Кокса, а также закон генетического равновесия Харди-Вайнберга).

При анализе данных в архивной и собственной группах частота полной моносомии хромосомы 3 составила 37,3%, частичной моносомии хромосомы 3 - 14,9%, делеции всего короткого плеча хромосомы 1 – 29,1%,

делеции всего короткого плеча хромосомы 8 – 20%. Нам удалось подтвердить корреляцию моносомии хромосомы 3 с такими значимыми клиническими и морфологическими факторами, как смешанноклеточный и эпителиоидноклеточный тип опухоли (51,1% и 26,7%, соответственно; p=0.0384), а также вовлечение в процесс цилиарного тела (51,1%, p=0.024). Наши результаты согласуются с данными большинства исследователей [23, 76, 125, 132, 134-135]. На основании полученных данных можно прогнозировать течение опухолевого процесса у больных УМ при выявлении цилиохориоидальной локализации опухоли, а также смешанноклеточного и эпителиоидноклеточного варианта опухоли при их сочетании с моносомией хромосомы 3. Ассоциация делеции всего короткого плеча хромосомы 1 и экстрабульбарного роста опухоли может свидетельствовать об относительно неблагоприятном характере данной мутации (16,7% против 10,3% в группе сравнения, р=0.04). Вместе с тем нам не удалось найти других подтверждений потенциально неблагоприятного влияния делеции всего короткого плеча хромосомы 1 на витальный прогноз. Выявление делеции короткого всего плеча хромосомы 8 не коррелирует ни с одним из изучаемых клинических и патогистологических критериев.

Частота метилирования гена RASSF1A в обеих группах составила 23,9%. Метилирование гена RASSF1A коррелирует с такими признаками, как малая высота опухоли (7,4 $\pm$ 1,4 мм против 9,5 $\pm$ 2,9 мм в группе сравнения, p=0,039), веретеноклеточный тип УМ (65,6% против 42,1% в группе сравнения, p=0,023), низкая частота экстрабульбарного роста (6,2% против 13,7% в группе сравнения, p=0,044) и сниженная акустическая плотность в области вершины опухоли (80,3 $\pm$ 14,2 у.е. против 98 $\pm$ 15,1 у.е. в группе сравнения, p=0,041), что также свидетельствует об ассоциации данного признака с улучшением витального прогноза. В литературе данные о роли гена RASSF1A несколько противоречивы; тем не менее, большинство исследователей подтверждают положительное значение данного гена для витального прогноза при УМ [17, 37, 54-55]. Метилирование гена SEMA3B ни

в одном из исследуемых образцов выявить не удалось, при этом в ряде исследователей показана частота до 20% [39]. Не исключена роль эпидемиологического фактора в профиле экспрессии генов человека, проживающего на определенной территории.

Нами показана высокая частота мутаций (90%) в онкогенах GNAQ и GNA11 при их определении в лейкоцитах периферической крови. Мутации в 5 экзоне (Gln209) в гене GNAQ найдены у 5 пациентов (16,7%), а в гене GNA11 у половины обследованных пациентов (50%). В 4 экзоне (Arg183) в гене GNAQ у 12 обследованных пациентов найдены гомозиготные мутации у 40% больных. В 4 экзоне (Arg183) гена GNA11 мутаций не найдено. При этом выявлена ассоциация между мутацией в экзоне 4 гена GNAQ и высокой отслойкой сетчатки (р=0,0472). Определение мутации в экзоне 5 гена GNA11 может свидетельствовать об относительной благоприятности опухолевого процесса, т.к. частота веретеноклеточного типа УМ при данной мутации практически в 3 раза выше (56% против 20%). Необходимо отметить, что большинство исследователей подтверждают высокую частоту мутаций в онкогенах GNAQ и GNA11 при УМ, а также несколько более низкую частоту — при кожной меланоме [120, 151-153]. При этом данные мутации не ассоциированы с ухудшением витального прогноза [151, 153].

Нами впервые в мире в эксперименте *in vivo* показана роль генотипа СС сайта СЗ435Т гена АВСВ1 в развитии УМ. В 80% случаев была выявлен аллель C, что свидетельствует о высокой специфичности данного аллеля для УМ. При этом в опытной группе аллель C встречался почти в 2 раза чаще, чем в контрольной (80% против 41,7%). Выявлена статистически значимая такими клинико-морфологическими ассоциация данного генотипа  $\mathbf{c}$ факторами, как умеренная пигментация опухоли и ее отсутствие, высота опухоли, наличие собственных сосудов. Особенно важным представляется ассоциация генотипа CCнеблагоприятными патогистолоческими факторами. Частоты генотипов CC и CT при веретеноклеточном типе опухоли не различались и составили по 50% (по 8 глаз в каждой группе). В

случае смешанноклеточного типа опухоли частота генотипа СТ составила 33% (n=3), тогда как частота генотипа СС была в 2 раза больше и составила 66% (n=6). При эпителиоидноклеточном типе опухоли разница была еще больше — частота генотипа СТ была 20% (n=1), а генотипа СС — 80% (n=4).-В объединенной группе с эпителиоидноклеточным и смешанноклеточным типом опухоли частота генотипа CT составила 30%, а генотипа CC — 70%. Таким образом, наличие аллеля T может свидетельствовать об относительной благоприятности опухолевого процесса. В одной из работ авторы показали взаимосвязь мутаций в гене ABCB1 с УМ в эксперименте  $in\ vitro\ [94]$ . В связи отсутствием в доступной отечественной и зарубежной литературе данных о взаимосвязи мутаций в генн ABCB1 и прогностических клинических и патогистологических критериев при УМ наши результаты можно считать пилотными.

Общая онкологическая 5-летняя выживаемость в нашем исследовании составила 69,2%, что согласуется с данными других исследователей [22, 137]. Средний срок наблюдения в общей группе пациентов составил 60,1±9,3 месяца, при этом средняя продолжительность жизни пациентов от ликвидационного хирургического гибели вследствие лечения ДО метастатической болезни  $-62.9\pm10.1$  месяца. В ходе анализа роли молекулярно-генетических изменений мы подтвердили негативную роль потери одной копии хромосомы 3 (моносомии хромосомы 3) (n=47) по сравнению с группой сравнения (n=57). В группе моносомии хромосомы 3 смертность от метастатической болезни превысила выживаемость (53,2% против 46,8%, p=0,0005), что свидетельствует о значимой роли моносомии хромосомы 3 в выживаемости пациентов с УМ. Также была показана умеренно позитивная роль метилирования гена RASSF1A (n=23). Так, в данной группе смертность составила 26,1% против 32,1% в группе сравнения (р=0,037 по регрессионной модели Кокса). Делеция всего короткого плеча хромосомы 1 не влияет на витальный прогноз.

Отдельный интерес для практических врачей представляет анализ клинических, патоморфологических и молекулярно-генетических критериев УМ В высоким риском метастазирования. связи некоторой однородностью группы пациентов (большие высота и диаметр основания опухоли) нами не учитывались данные факторы. Также не удалось выявить различий между группами по таким признакам, как возраст, пол пациентов, гемофтальма, наличие пигментации, вторичной отлойки сетчатки, субретинального экссудата видимых собственных сосудов. И Экстрабульбарный рост отмечался приблизительно с одинаковой частотой (12,5% и 9,7%), однако размер очагов в группе УМ с высоким риском метастазирования был выше. Так, в данной группе в 3 из 4 случаев были выявлены большие узлы размерами до 9х7 мм и лишь в одном – небольшие скопления клеток, в то время как в группе УМ с низким риском 5 метастазирования случаях ИЗ обнаруживали небольшие экстрабульбарные узлы размерами до 1х2 мм. Достоверно показано преобладание УМ смешанноклеточного и эпителиоидноклеточного типа (65,7% в группе УМ с высоким риском метастазирования против 52,8% в группе с низким риском метастазирования, p=0.03). Частота вовлечения в процесс цилиарного тела была значимо выше в группе УМ с высоким риском метастазирования (43,8% против 30,6%, p=0,018). Наличие моносомии хромосомы 3 значимо ухудшало витальный прогноз (78,1% в группе с высоким риском против 27.8% в группе с низким риском, p=0.002). молекулярно-генетических Отсутствие факторов исследуемых выделено как отдельный прогностический фактор, при этом получены значимые различия между группами (12,5% в группе с высоким риском метастазирования против 34,7% в группе с низким риском, р=0,007). Наши данные по основным клиническим и морфологическим прогностическим критериям соответствуют результатам других исследователей [23, 44, 137]. Отдельный интерес представляет такой малоизученный в литературе фактор, как наличие у пациента отягощенного семейного анамнеза в отношении онкологической патологии. Из 104 пациентов отягощенный семейный анамнез удалось выявить у 19, при этом получены значимые различия между группами (31,2% в группе УМ с высоким риском метастазирования против 12,5% в группе с низким риском метастазирования, p=0,002). Эти результаты могут свидетельствовать о роли наследственного фактора как проявления семейной гетерогенности генетического профиля и требуют дальнейшего изучения.

Несмотря на достигнутые успехи, в молекулярной офтальмоонкологии остается еще много неизученных механизмов. Поиск новых маркеров УМ и их взаимосвязи с клиническими и морфологическими характеристиками опухоли, безусловно, будет продолжен, т.к. конечная задача — эффективное прогнозирование и предупреждение УМ, а также возможность таргетной терапии опухоли — до сих пор не решена. При этом необходимо отметить, что данные исследования в перспективе будут иметь особенное практическое значение для группы тяжелых пациентов с УМ, а также их родственников и людей, относящихся к группе риска по данному заболеванию.

## Выводы

- 1) Выявлено, что общая 5-летняя онкологическая выживаемость при УМ составила 69,2%. Наличие потери одной копии 3 значимо снижает выживаемость до 46,8% (p=0,0005). Значимых различий в выживаемости при наличии делеции всего короткого плеча хромосомы 1 и в группе сравнения не выявлено. Выживаемость при наличии метилирования гена *RASSF1A* значимо выше, чем в группе сравнения, и составила 73,9% (p=0,037).
- 2) Установлена частота герминальных и соматических хромосомных и генных нарушений у больных увеальной меланомой: потеря одной копии хромосомы 3-52,2% (полная 37,3%, частичная 14,9%), делеция всего короткого плеча хромосомы 1-29,1%, делеции всего короткого плеча хромосомы 8-20,0%; метилирование гена RASSF1A-23,9%, мутации в генах GNAQ/GNA11-90,0%. Метилирование гена SEMA3B ни в одном из исследуемых образцов не выявлено, генотип CC сайта C3435T гена ABCB1 выявлен в 60,0%, генотип CT- в 40,0% случаев, генотип TT не выявлен.
- 3) Выявлена группа неблагоприятных для витального прогноза при молекулярно-генетических факторов: увеальной меланоме взаимосвязь цилиарной локализацией опухоли (51,1%;p=0.024), между эпителиоидноклеточным и смешанноклеточным гистологическими типами увеальной меланомы (26,7% и 51,1%, соответственно; p=0,0384) и потерей одной копии хромосомы 3 (р=0,001). Доказано, что экстрабульбарный рост увеальной меланомы значимо чаще сопровождается наличием делеции всего короткого плеча хромосомы 1 (16,7%, р=0,04). Впервые удалось установить, опухоли что высота (p=0.0391),эпителиоидноклеточный смешанноклеточный гистологические типы увеальной меланомы (p=0,0493)

и умеренная пигментация опухоли (p=0,05) коррелируют с генотипом *CC* сайта *C3435T* гена *ABCB1*.

- 4) Установлен ряд молекулярно-генетических факторов, улучшающих витальный прогноз при увеальной меланоме. Прогностически наиболее благоприятный веретеноклеточный тип увеальной меланомы значимо чаще отмечался при наличии метилирования гена RASSF1A (p=0,023) и мутации в экзоне 5 гена *GNA11* (p=0,03). Показано, что небольшая высота опухоли  $(7.4\pm1.4 \text{ мм; p=0.039})$ , низкая встречаемость экстрабульбарного роста (6,2%;p=0.044) И сниженные значения акустической плотности в области верхушки опухоли (80,3±14,2 у.е.; p=0,041) коррелировали с метилированием гена RASSF1A. Ни в одном из исследуемых образцов увеальной меланомы нам не удалось обнаружить генотип *TT* сайта *C3435T* гена *ABCB1*.
- 5) Выявлено, что для больных увеальной меланомой с высоким риском метастазирования характерно наличие потери одной копии хромосомы 3 (78,1%, p=0,0001), преобладание смешанноклеточного и эпителиоидноклеточного варианта опухоли (65,7%, p=0,018), более высокая частота увеальной меланомы с вовлечением цилиарного тела (p=0,026), а также увеличенные размеры экстрабульбарных узлов (p=0,034).

## Практические рекомендации

- 1) При выявлении в ходе офтальмологического обследования пациентов таких признаков, как вовлечение в опухолевый процесс цилиарного тела и/или экстрабульбарного роста увеальной меланомы рекомендуется проведение молекулярно-генетического анализа с определением потери одной копии хромосомы 3 и делеции всего короткого плеча хромосомы 1, что свидетельствует о худшем витальном прогнозе.
- 2) При сомнении в патогистологическом диагнозе или для проведения дифференциального диагноза рекомендуется комплексный молекулярно-генетический анализ полученного материала, включающий оценку статуса хромосом 3, 1 и 8.
- 3) Для проведения скрининга лиц из группы риска (родственники пациентов с увеальной меланомой) рекомендуется проведение анализа статуса таких генов, как *RASSF1A*, *ABCB1*, *GNAQ/GNA11*. Определение последних двух маркеров возможно в лейкоцитах периферической крови.
- 4) Создание генетических лабораторий при крупных офтальмоонкологических центрах и обучение персонала генетических лабораторий общего профиля для работы с образцами опухолей глаза и придаточного аппарата.

## Список использованной литературы

- 1. Брендель Д.И. Роль морфологических критериев и иммуногистохимических маркеров в прогнозе увеальной меланомы : автореф. дис. ... канд.мед.наук : 14.01.07 / Брендель Дина Ивановна. Новосибирск. 2004. 25 с.
- 2. Бровкина А.Ф. Тонкоигольная аспирационная биопсия в диагностике опухолей органа зрения: Пособие для врачей / А.Ф.Бровкина, М.Г. Жильцова, А.В. Каплина. Москва. 2000.
- 3. Бровкина, А.Ф. Офтальмоонкология Текст.: пособие для врачей / А.Ф. Бровкина. -М.: Медицина, 2002. 424с.
- 4. Величко Л.Н., Особенности взаимодействия клеток меланомы с макрофагами периферической крови больных увеальной меланомой при различных типах реакции опухоли на лечебное воздействие: Сб. работ междунар. симпозиума «Опухоли и опухолевые заболевания» / Л.Н. Величко, В.В. Вит, Л.С. Терентьева Одесса. 2007. С. 3-5.
- Вит, В.В. Морфологические и биологические особенности новообразований меланогенной системы радужной оболочки Текст. / В.В. Вит // Офтальмол. журн. 1987. № 3. С. 191-192.
- 6. Гришина Е.Е. Анализ офтальмоонкологической патологии у взрослого населения Москвы по данным МОКБ / Е.Е. Гришина, О.Ф. Федотова, В.П. Житенев // Опухоли и опухолеподобные заболевания органа зрения.- Москва. Медицина. 1998. стр. 28-31.
- 7. Жидкова А.С. Прогнозирование течение увеальной меланомы (клинико-морфологическое исследование): дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 /Жидкова Анна Сергеевна. Челябинск, 2009. 131 с.

- 8. Залетаев Д.В. Система генетических и эпигенетических маркеров в ДНК-диагностике злокачественных новообразований / Д.В. Залетаев, М.В. Немцова, О.В. Бабенко. В кн.: Введение в молекулярную медицину (под ред. Пальцева М.А.). Москва. Медицина. 2009. С. 35-93.
- 9. Зиангирова, Г.Г. Опухоли сосудистого тракта глаза / Г.Г. Зиангирова, В.Г. Лихванцева // Москва. Последнее слово. 2003. стр. 456.
- 10. Каверина, З.А. Клинико-морфологические параллели при внутриглазных меланомах по результатам длительных, наблюдений Текст. / З.А. Каверина. // Достижения и перспективы; офтальмоонкологии: сб. тр. юбилейн. науч.-практ. конф. М., 2001. С. 116-117.
- 11. Логинов В.И. Делеционное картирование короткого плеча хромосомы 3 человека и спектр метилирования генов RASSF1A, SEMA3B и RAR-beta 2 в эпителиальных опухолях разных локализаций : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.03 / Логинов Виталий Игоревич. М.,2004. 170 с.
- 12. Манохина И.К. Характеристика молекулярной патологии в увеальных меланомах: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Манохина Ирина Константиновна. М., 2009. 87 с.
- 13. Манохина И.К. Сравнительный анализ молекулярных нарушений в патогенезе увеальной меланомы и меланомы кожи / И.К. Манохина [и соавт.] // Российский офтальмологический журнал. 2010. №2. стр. 13-15.
- 14. Поддубная И.В. Гистологические и гистоиммунохимические особенности увеальной меланомы при первично-множественном поражении и солитарной увеальной меланоме / И.В. Поддубная [и соавт.] // Актуальные вопросы клинической онкологии. 2003. Том 5 №3 стр.132-133.
- 15. Саакян С.В. Достижения и перспективы онкоофтальмологии / С.В. Саакян // Сборник научных трудов «Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей». М. 2007. С. 1-17.
- 16. Саакян С.В. Особенности клинического течения и витальный прогноз при увеальной меланоме у пациентов молодого возраста /

- С.В.Саакян, А.Г. Амирян, А.Ю. Цыганков // Вестник офтальмологии. 2013.- №6. стр. 4-9.
- 17. Саакян С.В. Молекулярно-генетические нарушения при увеальной меланоме / С.В. Саакян, А.Г. Амирян, А.Ю. Цыганков, Н.В. Склярова // Онкохирургия. 2013. Том 5. спецвыпуск №1. Стр.117.
- 18. Саакян С.В. Опухоли сосудистой оболочки глаза. / С.В. Саакян, А.Ф. Бровкина. В кн.: Офтальмоонкология: Руководство для врачей (под ред. Бровкиной А.Ф.) // Москва. Медицина. 2002. стр. 235-298.
- 19. Саакян С.В. Особенности метастатического поражения и выживаемости больных с увеальной меланомой в зависимости от метода проведенного лечения / С.В. Саакян, О.Г. Пантелеева, Т.В. Ширина // Российский офтальмологический журнал. 2012. Том 5. №2.- стр.55-57.
- 20. Саакян С.В. Мутации в онкогенах GNAQ и GNA11 у больных увеальной меланомой / С.В. Саакян [и соавт.] // Сборник научных трудов VI Российского общенационального офтальмологического форума. М. 2013. Т.2. стр. 543-546.
- 21. Саакян С.В. Мутации в онкогенах GNAQ и GNA11 у больных увеальной меланомой / С.В. Саакян [и соавт.] // Молекулярная медицина. 2014. №2. стр. 34-37.
- 22. Саакян С.В. Внутриглазная шваннома: клиникопатоморфологический анализ случая / С.В. Саакян [и соавт.] // Вестник офтальмологии. – 2014. - №2. - стр. 54-58.
- 23. Саакян С.В. Ассоциация гена ABCB1 с риском развития увеальной меланомы / С.В. Саакян [и соавт.] // Архив патологии. 2014. №2. стр. 3-7.
- 24. Склярова Н. В. Флюоресцентная ангиография в диагностике беспигментных меланом хориоидеи : дис. ... канд.мед.наук : 14.00.08 / Склярова Натэлла Владимировна. М. 2004. 123 с.
- 25. Сычев Д.А. Значение полиморфизма гена *MDR1*, кодирующего гликопротеин-Р, для индивидуализации фармакотерапии / Д.А. Сычев [и

- соавт]. // Клиническая фармакология и терапия. 2005. т.14. №1. стр.92-96.
- 26. Цыганков А.Ю. Ассоциация гена ABCB1 с риском развития увеальной меланомы у российских пациентов / А.Ю. Цыганков, С.В. Саакян // Сборник тезисов 36 итоговой научной конференции ОМУ МГМСУ им. А.И. Евдокимова. М. 2014. стр. 162-163.
- 27. Цыганков А.Ю. Взаимосвязь полиморфизма гена ABCB1/MDR1 с клинико-морфологическими характеристиками при увеальной меланоме / А.Ю. Цыганков [и соавт.] // Онкохирургия. 2014. т.б. стр.65-66.
- 28. Цыганков А.Ю. Влияние молекулярно-генетических изменений на прогноз при увеальной меланоме А.Ю. Цыганков [и соавт.] // Онкохирургия. 2014. т.б. стр.66-67.
- 29. Цыганков А.Ю. Роль молекулярно-генетических факторов в выживаемости пациентов с увеальной меланомой цилиохориоидальной локализации / А.Ю. Цыганков, С.В. Саакян, А.Г. Амирян // Медицинский вестник Башкортостана. 2014. т. 9. №2. стр. 147-150.
- 30. Ширина Т.В. Витальный прогноз при увеальной меланоме в отдаленные сроки после лечения : дис. ... канд.мед.наук : 14.01.07 / Ширина Татьяна Владимировна М. 2013. 142 с.
- 31. Abdel-Rahman M.H. Monosomy 3 status of uveal melanoma metastases is associated with rapidly progressive tumors and short survival / M.H. Abdel-Rahman [et al.] // Exp Eye Res − 2012. − № 100. − P. 26-31.
- 32. Abdel-Rahman, M.H. High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma / M.H. Abdel-Rahman [et al.] // J Clin Oncol. − 2006. Vol. 24. № 2. P. 288-295.
- 33. Abourbih D.A. Lysyl oxidase expression and inhibition in uveal melanoma / D.A. Abourbih [et al.] // Melanoma Res. 2010. Vol. 20. №2. P.97-106.

- 34. Albert D.M. Ocular Oncology, 1st edition / D.M. Albert, A. Polans // Informa Health Care. 2003 ISBN-10: 0824740165, 492 pages.
- 35. All-Ericsson C. Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target./ C. All-Ericsson [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002. Vol. 43. №1. P.1-8.
- 36. Barak V. VEGF as a biomarker for metastatic uveal melanoma in humans / V. Barak [et al.] // Curr Eye Res. 2011. Vol. 36. №4. P.386-390.
- 37. Bauer, J. Oncogenic GNAQ mutations are not correlated with disease-free survival in uveal melanoma / J. Bauer [et al.] // Br J Cancer. -2009. Vol.  $101. N_{\odot} 5. P. 813-815$ .
- 38. Bell D.J., Wilson M.W. Choroidal melanoma: natural history and management options / D.J. Bell, M.W. Wilson // Cancer Control. 2004. Vol. 11. № 5. P. 296-303.
- 39. Beran T.M. Reactions to and desire for prognostic testing in choroidal melanoma patients / T.M. Beran [et al.] // J Genet Couns. 2009 №18. P. 265–274.
- 40. Bergman L. Uveal melanoma: a study on incidence of additional cancers in the Swedish population / L. Bergman [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. −2006. Vol.47. №1. P. 72-77.
- 41. Biswas J. Clinical and histopathological characteristics of uveal melanoma in asian indians. A study of 103 patients / J. Biswas [et al.] // Ind. J. Ophthalmol. 2004. Vol. 54. P. 41-44.
- 42. Bolander A. The role of circulating angiogenic actors in patients operated on for localized malignant melanoma / A. Bolander [et al] // Anticancer Res. 2007. №27. P. 3211-3217.
- 43. Boldt H.C. Posterior segment tumors: the latest in current management / H.C. Boldt // Retina. 2006. №26. P. 37-44.
- 44. Brantley, M.A. Deregulation of the Rb and p53 pathways in uveal melanoma / M.A. Brantley, J. W. Harbour // Am J Pathol. − 2000. Vol. 157. № 6. P. 1795-1801.

- 45. Calipel A. Status of RASSF1A in uveal melanocytes and melanoma cells / A. Calipel [et al.] // Mol Cancer Res. 2011. №9. P. 1187-1198.
- 46. Calipel, A. Extracellular signal-regulated kinase-dependent proliferation is mediated through the protein kinase A/B-Raf pathway in human uveal melanoma cells / A. Calipel [et al.] // J Biol Chem. − 2006. Vol. 281. №. 14. P. 9238-9250.
- 47. Castro-Rivera E. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect / E. Castro-Rivera [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. 2004. Vol. 101. №31. P.11432-11437.
- 48. Chana, J.S. c-myc, p53, and Bcl-2 expression and clinical outcome in uveal melanoma / J.S. Chana [et al.] // Br J Ophthalmol. − 1999. Vol. 83. №1. − P.110-114.
- 49. Chen X. Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma / X. Chen [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011. Vol.52. №3. P.1193-1199.
- 50. Cohen, Y. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma / Y. Cohen [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003. Vol. 44. №7. P.2876-2878.
- 51. Comparison of clinical, echographic, and histopathological measurements from eyes with medium-sized chorioidal melanoma in the collaborative ocular melanoma study Text. / COMS // Arch. Ophthalmol. 2003. Vol. 121.  $N_2$  8. -P. 1163-1171.
- 52. Coupland S.E, Campbell I., Damato B. Routes of extraocular extension of uveal melanoma: risk factors and influence on survival probability / S.E. Coupland, I. Campbell, B. Damato // Ophthalmology. 2008. Vol. 115. № 10. P. 1778-1785.
- 53. Coupland S.E. Metastatic choroidal melanoma to the contralateral orbit 40 years after enucleation / S.E. Coupland [et al.] // Arch Ophthalmol. 1998. Vol. 114. №6.- P. 751-756.

- 54. Coupland, S.E. The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma / S.E. Coupland [et al.] // J Pathol. 2000. Vol. 191. №2. P. 120-126.
- 55. Coupland, S.E. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma / S.E. Coupland [et al.] // Br J Ophthalmol. 1998. Vol. 82. №8. P. 961-970.
- 56. Damato B., Coupland S.E. Genomic typing of uveal melanoma / B. Damato, S.E. Coupland // Arch Ophthalmol. 2009. №127. P.113-114.
- 57. Damato B. Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience / B. Damato [et al.] // Ophthalmology. 2007. Vol. 114. №10. P.1925-1931.
- 58. Davies, H. Mutations of the BRAF gene in human cancer / H. Davies [et al.] // Nature. 2002. Vol. 417. №6892. P. 949-954.
- 59. D'Hermies F. Macroscopic and histological data in the prognosis of malignant choroidal melanoma / F. D`Hermies // J Fr Ophtalmol. -2007. Vol.30. N01. P.99-107.
- 60. Dhomen, N. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma / N. Dhomen, R. Marais // Hematol Oncol Clin North Am. 2009. Vol. 23. №3. P. 529-545.
- 61. Diener-West M. A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988 / M. Diener-West [et al.] // Arch Ophthalmol. 1992. Vol. 110. №2. P. 245-250.
- 62. Donninger H. The RASSF1A tumor suppressor / H. Donninger, M.D. Vos, G.J. Clark // J Cell Sci. 2007. -Vol. 120. №18. P. 3163-3172.
- 63. Donninger H. RASSF1A and the rs2073498 cancer associated SNP / H. Donninger [et al.] // Front Oncol. 2011. -Vol.1. №54. P. 1-7.
- 64. Dopierala J. Genetic heterogeneity in uveal melanoma assessed by multiplex ligation-dependent probe amplification / J. Dopierala [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010. Vol.51. №10. P.4898-4905.

- 65. Dratviman-Storobinsky, O. Lack of oncogenic GNAQ mutations in melanocytic lesions of the conjunctiva as compared to uveal melanoma / O. Dratviman-Storobinsky [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. − 2010. Vol. 51. №12. P.6180-6182.
- 66. Economou M.A. Receptors for the liver synthesized growth factors IGF-1 and HGF/SF in uveal melanoma: intercorrelation and prognostic implications / M.A. Economou [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. − 2005. Vol. 46. №12. − P.4372-4375.
- 67. Egan K.M. Epidemiologic aspects of uveal melanoma / K.M. Egan [et al.] // Surv Ophthalmol. 1988. Vol. 32. №4. P.239- 251.
- 68. Ehlers J.P. Molecular pathobiology of uveal melanoma / J.P. Ehlers, J.W. Harbour // Int Ophthalmol Clin. -2006. Vol. 46. №1. P.167-180.
- 69. Ehlers, J.P. NBS1 expression as a prognostic marker in uveal melanoma / J.P. Ehlers, J.W. Harbour // Clin Cancer Res. 2005. Vol. 11. №5. P. 1849-1853.
- 70. Ehlers, J.P. Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma / J.P. Ehlers [et al.] // Clin Cancer Res. 2008. Vol.14. №1. P.115-122.
- 71. El Filali M. Regulation of VEGF-A in uveal melanoma / M. El Filali [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010. Vol. 51. №5. P.2329-2337.
- 72. Fernandes B.F. Circulating uveal melanoma cells: should we test for them? / B.F. Fernandes [et al.] // Can J Ophthalmol. 2008. Vol. 43. №2. P. 155-158.
- 73. Finger P.T. The 7<sup>th</sup> edition AJCC staging system for eye cancer: an international language for ophthalmic oncology / P.T. Finger // Arch Pathol Lab Med. 2009. Vol.133. №8. P.1197-1198.
- 74. Folberg R. The molecular classification of uveal melanocytic lesions: an important discovery in context / R. Folberg // J Mol Diagn. 2010. Vol. 12. №4. P. 391-393.

- 75. Folberg R. Vasculogenic mimicry / R. Folberg, A.J. Maniotis // APMIS. 2004. Vol. 112. №7-8. P. 50825.
- 76. Foss A. Modelling uveal melanoma text / A. Foss [et al.] // Br. J. Ophthalmol. 1999. Vol. 83. P.588-594.
- 77. Gamel, J.W. A comparison of prognostic covariates for uveal melanoma. / J.W. Gamel, J.B. McCurdy, I.W. McLean // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. -1992.-Vol. 33. P. 1919-1922.
- 78. Gamel, J.W. Computerized histopathologic assessment of malignant potential.III. Refinements of measurement and data analysis. / J.W. Gamel, I.W. McLean // Anal. Quant. Cytol. 1984. Vol. 6. №1. P. 37-44.
- 79. Gamel, J.W. Modern developments in histopathologic assessment of uveal melanomas Text. / J.W. Gamel, I.W. McLean // Ophthalmology. 1984. Vol. 91. № 6. P. 679-684.
- 80. Günduz K. Surgical removal of solitary hepatic metastasis from choroidal melanoma / K. Günduz [et al.] // Am J Ophthalmol. 1998. Vol. 125. №3. P.407-409.
- 81. Harbour J.W. Molecular prognostic testing and individualized patient care in uveal melanoma / J.W. Harbour // Am J Ophthalmol. 2009 №148. P. 823–829.
- 82. Harbour J.W. Association between choroidal pigmentation and posterior uveal melanoma in a white population / J.W. Harbour [et al.] // Br J Ophthalmol. -2004. -Vol. 88. -Nel. -P. 39-43.
- 83. Harbour, J.W. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas / J.W. Harbour [et al.] // Science. 2010. Vol. 330. №6009. P. 1410-1413.
- 84. Häusler T. Loss of heterozygosity of lp in uveal melanomas with monosomy 3 / T. Häusler // Int J Cancer. 2005. Vol. 116. -№6. P. 909-913.
- 85. Henriquez, F. The T1799A BRAF mutation is present in iris melanoma / F. Henriquez [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. Vol. 48. №11. P. 4897-4900.

- 86. Herlyn, M. Taking the guesswork out of uveal melanoma / M. Herlyn, K.L. Nathanson // N Engl J Med. 2010. Vol. 363. №23. P. 2256-2257.
- 87. Hill H.Z. UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma / H.Z. Hill, G.J. Hill // Pigment Cell Res. − 2000. №8. − P.140-144.
- 88. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study Text. / COMS report №6 // Am. J. Ophthalmol. 1998. Vol. 125. №6. P. 745-766.
- 89. Houlston R.S. Genetic predisposition to ocular melanoma / R.S. Houlston, B.E. Damato // Eye. 1999. Vol. 13. P. 43-46.
- 90. Hovland P.G. Genomic investigations of posterior uveal melanoma / P.G. Hovland, C. Trempe// Semin Ophthalmol. 2005. Vol. 20. №4. P. 231-238.
- 91. Hughes S. Microarray comparative genomic hybridisation analysis of intraocular uveal melanomas identifies distinctive imbalances associated with loss of chromosome 3 / S. Hughes [et al] // Br J Cancer. − 2005. −Vol.93. №10. − P. 1191-1196.
- 92. Ibrahim, N. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms / N. Ibrahim, F.G. Haluska // Annu Rev Pathol. 2009. Vol. 4. P. 551-579.
- 93. Inamdar, G.S. Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail / G.S. Inamdar, S.V. Madhunapantula, G.P. Robertson // Biochem Pharmacol. 2010. Vol. 80. №5. P. 624-637.
- 94. Jensen, D.E. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression / D.E. Jensen [et al]. // Oncogene. 1998. Vol. 16. №9. P. 1097-1112.
- 95. Johansson C.C. Expression and prognostic significance of iNOS in uveal melanoma / C.C. Johansson [et al.] // Int J Cancer. − 2010. − Vol. 126. №11. − P.2682-2689.
- 96. Kilic E. Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma / E.Kilic [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006. Vol. 47. №9. P. 3703-3707.

- 97. Kilic, E. The RAS-BRAF kinase pathway is not involved in uveal melanoma / E. Kilic [et al.] // Melanoma Res. 2004. Vol. 14. №3. P. 203-205.
- 98. Klagsbrun M. Semaphorin 3E, an exception to the rule / M. Klagsbrun, A. Shimizu // J Clin Invest. 2010. –Vol.120. №8. P.2658-2660.
- 99. Kvam E. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells / E. Kvam, R.M. Tyrrell // J Invest Dermatol. 1999. Vol.113. №2. P. 209-213.
- 100. Lake S.L. Whole-genome microarray detects deletions and loss of heterozygosity of chromosome 3 occuring exclusively in metastazing uveal melanoma / S.L. Lake [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. − 2010. − Vol.51. №10. − P. 4884-4891.
- 101. Landreville S. Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma / S. Landreville, O.A. Agapova, J.W. Harbour // Future Oncol.-2008 №4. P. 629–636.
- 102. Landreville S. ABCB1 identifies a subpopulation of uveal melanoma cells with high metastatic propensity / S. Landreville [et al.] // Pigment Cell Melanoma Res. 2011. Vol.24. №3. P. 430–437.
- 103. Lane A.M. An evaluation of tumour vascularity as a prognostic indicator in uveal melanoma / A.M. Lane [et al.] // Melanoma Res. − 1997. Vol.7. №3. P. 237-242.
- 104. Laver N.V. Ocular melanoma / N.V. Laver, M.E. McLaughlin, J.S. Duker // Arch Pathol Lab Med. 2010. Vol.134. №12. P. 1778-1784.
- 105. Lee W.H. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence / W.H. Lee [et al.] // Science. 1987. Vol. 235. №4794. P. 1394-1399.
- 106. Maat W. Epigenetic inactivation of RASSFla in uveal melanoma / W. Maat [et al]. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007. Vol. 48. №2. P. 486-490.

- 107. Maat W. Epigenetic regulation identifies RASEF as a tumor-supressor gene in uveal melanoma / W. Maat [et al]. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008. Vol. 49. №4. P. 1291-1298.
- 108. Manschot, W.A. Uveal melanoma: therapeutic consequences of doubling times and irradiation results; a review / W.A. Manschot, R. van Strik // Int. Ophthalmol. 1992. Vol.16. №2. P. 91-99.
- 109. McGill, G.G. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability / G.G. McGill [et al.] // Cell. 2002. Vol. 109. №6. P. 707-718.
- 110. McLean I.W. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology / I.W. McLean [et al.] // Am J Ophthalmol. 1983. Vol. 96. №4. P. 502-509.
- 111. McLean I.W. Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis / I.W. McLean, W.D. Foster, L.E. Zimmerman // Hum Pathol. 1982. Vol. 13. №2. P. 123-132.
- 112. McLean I.W. Pathological and prognostic features of uveal melanomas / I.W. McLean, V.S. Saraiva, M.N. Burnier Jr. // Can J Ophthalmol. 2004. №39. P. 343–350.
- 113. Meir T. The spatial distribution of monosomy 3 and network vasculogenic mimicry patterns in uveal melanoma / T. Meir [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007. Vol. 48. №5. P. 1918-1922.
- 114. Mensink H.W. Chromosome 3 intratumor heterogeneity in uveal melanoma / H.W. Mensink [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009. Vol.50. №2. P. 500–504.
- 115. Mercer, K.E. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target / K.E. Mercer, C.A. Pritchard // Biochim Biophys Acta. Vol.  $1653. N_{\odot}1. P. 25-40.$
- 116. Messmer E. Histopathologic findings in eyes treated with a ruthenium plaque for uveal melanoma / E. Messmer [et al]. // Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1992. Vol. 230. №4. P. 391-396.

- 117. Mikhaïlenko D.S. Inactivation of the VHL gene in sporadic clear cell renal cancer / D.S. Mikhailenko [et al.] // Mol Biol (Mosk). 2008. Vol. 42. №1. P. 71-77.
- 118. Miller A.J. Melanoma / A.J. Miller, M.C. Mihm // N Engl J Med. 2006. Vol. 355. №1. P.51-65.
- 119. Moulin A.P. Methylation of CpG island promoters in uveal melanoma / A.P. Moulin [et al.] // Br J Ophthalmol. 2008. Vol. 92. №2. P. 281-285.
- 120. Mouriaux F. Normal and malignant choroidal melanocytes: from cell to clinical approach / F. Mouriaux [et al.] // J Fr Ophtalmol. 2005. Vol. 28. №7. P.781-793.
- 121. Mudhar H.S. A critical appraisal of the prognostic and predictive factors for uveal malignant melanoma / H.S. Mudhar [et al.] // Histopathology. 2004. -Vol. 45. №1.- P.1-12.
- 122. Nareyeck G. Establishment and characterization of two uveal melanoma cell lines derived from tumors with loss of one chromosome 3 / G. Nareyeck [et al.] // Exp Eye Res. 2006. №83. P. 858-864.
- 123. Neumann L.C. EFS shows biallelic methylation in uveal melanoma with poor prognosis as well as tissue-specific methylation / L.C. Neumann [et al.] // BMC Cancer. 2011. N 11. P.380.
- 124. Onken M.D. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death / M.D. Onken [et al.] // Cancer Res. 2004. №64. P. 7205–7209.
- 125. Onken M.D. Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas / M.D. Onken [et al.] // Cancer Res. 2006. Vol. 66. №9. P. 4602-4609.
- 126. Onken M.D. A metastasis modifier locus on human chromosome 8p in uveal melanoma identified by integrative genomic analysis / M.D. Onken, L.A. Worley, J.W. Harbour // Clin Cancer Res. 2008. Vol.14. №12. P. 3737-3745.

- 127. Onken M.D. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma / M.D. Onken [et al.] // J Mol Diagn. 2010. №12. P. 461-468.
- 128. Onken, M.D. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma / M.D. Onken [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. − 2008. Vol.49. №12. − P. 5230-5234.
- 129. Patel, M. Therapeutic Implications of the Emerging Molecular Biology of Uveal Melanoma / M. Patel [et al.] // Clin Cancer Res. 2011. Vol. 17. №8. P. 2087-2100.
- 130. Pinzani P. Tyrosinase mRNA levels in the blood of uveal melanoma patients: correlation with the number of circulating tumor cells and tumor progression / P. Pinzani [et al.] // Melanoma Res. − 2010/ Vol.20. №4. − P. 303-310.
- 131. Pollock P.M. High frequency of BRAF mutations in nevi / P.M. Pollock [et al.] // Nat Genet. 2003. Vol. 33. №1. P. 19-20.
- 132. Ponder B.A. Inherited cancer syndromes. / Book: Genes and cancer. (Carney D, Sikora K, editor) New York, John Wiley and Sons. 1990. -P. 99- 106.
- 133. Prescher G. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma / G. Prescher [et al.] // Lancet. 1996. Vol.347. №9010. P. 1222-1225.
- 134. Raoof N. What is the significance of vortex vein invasion in uveal melanoma? / N. Raoof [et al.] // Eye. 2008. Vol. 23. №3. P. 549-555.
- 135. Rastetter M. Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma / M. Rastetter [et al.] // Histol Histopathol. 2007. Vol. 22. №9. P. 1005-1015.
- 136. Romano, E. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma / E. Romano [et al.] // Lancet Oncol. -2011. Vol. 12. N9. P. 913-922.
- 137. Saakyan S. Schwannoma of the ciliary body (clinical case) / S. Saakyan [et al.] // Acta Ophthalmologica. 2012. Vol. 90. P.249.

- 138. Saakyan S.V. Histopathological findings correlating with monosomy 3 and *RASSF1A* methylation in uveal melanoma / S.V. Saakyan, A.G. Amiryan, A.Yu. Tsygankov // OOG 2013 Ivalo Spring Meeting Abstract book p.12.
- 139. Saakyan S. Prognostic value of monosomy 3 and RASSF1A methylation in uveal melanoma / S. Saakyan, A. Amiryan, A. Tsygankov, N. Sklyarova // Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE) 8–11 June, 2013, Copenhagen, Denmark Abstract Book p.148.
- 140. Saakyan S.V. GNAQ/GNA11 mutations and ABCB1/MDR1 polymorphism in uveal melanoma: association with clinical and morphological features / S.V. Saakyan [et al.] // OOG 2014 Krakow Spring Meeting Abstract book p.23.
- 141. Sakamoto T. Histologic findings and prognosis of uveal malignant melanoma in japanese patients / T. Sakamoto [et al.] // Am J Ophthalmol. 1996. Vol.121. №3. P. 276-283.
- 142. Saldanha, G. High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types / G. Saldanha [et al.] // Int J Cancer. − 2004. Vol. 111. №5. P.705-710.
- 143. Sandberg A.A. Cytogenetics and molecular genetics of human cancer . A.A. Sandberg, Z. Chen // Am J Med Genet. 2002. Vol. 115. №3. P. 111-112.
- 144. Sandinha M.T. Identification of monosomy 3 in choroidal melanoma by chromosome in situ hybridisation / M.T. Sandinha, M.A. Farquharson, F. Roberts // Br J Ophthalmol. 2006. Vol. 88. №12. P. 1527-1532.
- 145. Saornil M.A. Iris colour and uveal melanoma / M.A. Saornil // Can J Ophthalmol. 2004. Vol.39. №4. P. 448-452.
- 146. Schoenfield L. Variation of monosomy 3 status within uveal melanoma / L. Schoenfild // Arch Pathol Lab Med. 2009. №133. P. 1219-1222.

- 147. Scholes A.G. Monosomy 3 in uveal melanoma: correlation with clinical and histologic predictors of survival / A.G. Scholes // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003. Vol. 44. №3. P. 1008-1011.
- 148. Schuster R. Circulating tumor cells as prognostic factor for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma / R. Schuster // Clin Cancer Res. 2007. Vol. 13. №4. P. 1171-1178.
- 149. Seddon J.M. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma / J.M. Seddon [et al.] // Arch Ophthalmol. 1983. Vol.101. №12. P. 1894-1899.
- 150. Shields C.L. The hunt for the secrets of uveal melanoma / C.L. Shields // Clin Experiment Ophthalmol. 2008. Vol. 36. № 3. P. 277-280.
- 151. Singh A.D.Uveal melanoma: genetic aspects / A.D. Singh [et al.] // Ophthalmol Clin North Am. 2005. Vol. 18. №1. P. 85-97.
- 152. Singh A.D. Familial uveal melanoma. Clinical observations on 56 patients / A.D. Singh [et al.] // Arch Ophthalmol. 1996. Vol. 114. № 4. P. 392-399.
- 153. Singh A.D. Prognostic factors in uveal melanoma / A.D. Singh, C.L. Shields, J.A.Shields // Melanoma Res. 2001. Vol. 11. № 3. P. 255-263.
- 154. Sisley I.C. Association of specific chromosome alterations with tumour phenotype in posterior uveal melanoma / I.C. Sisley [et al.] // Br J Cancer. 2000. Vol. 82. №2. P. 330-338.
- 155. Sisley, K. What hope for the future? GNAQ and uveal melanoma / K. Sisley, R. Doherty, N.A. Cross // Br J Ophthalmol. 2011. Vol. 95. №5. P. 620-623.
- 156. Sullivan, R.J. Molecular targeted therapy for patients with melanoma: the promise of MAPK pathway inhibition and beyond / R.J. Sullivan, M.B. Atkins // Expert Opin Investig Drugs. 2010. Vol. 19. №10. P.1205-1216.
- 157. Sunami E. Analysis of methylated circulating DNA in cancer patients` blood / E. Sunami [et al.] // Methods Mol Biol. 2009. №507. P.349-356.

- 158. Triozzi, P.L. Targeted therapy for uveal melanoma / P.L. Triozzi, C. Eng, A.D. Singh // Cancer Treat Rev. 2008. Vol. 34. №3. P. 247-258.
- 159. Tschentscher F. Partial deletions of the long and short arm of chromosome 3 point to two tumor suppressor genes in uveal melanoma / F. Tschentscher [et al.] // Cancer Res. 2001. Vol. 61. № 8. P. 3439-3442.
- 160. Ulmer A. Visualization of circulating melanoma cells in peripheral blood of patients with primary uveal melanoma / A. Ulmer [et al.] // Clin Cancer Res. 2008. Vol. 14. №14. P. 4469-4474.
- 161. Van den Bosch T. Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind? / T. Van den Bosch [et al.] // Dermatol Res Pract. 2010. Vol. 48. p. 36-38.
- 162. Van den Bosch, T. Higher percentage of FISH-determined monosomy 3 and 8q amplification in uveal melanoma cells relate to poor patient prognosis / T. Van den Bosch [et al.] // Invest Opthalmol Vis Sci. − 2012. − Vol.53. №6. − P. 2668-2674.
- 163. Van Raamsdonk C.D. Mutations in GNA11 in uveal melanoma / C.D. Van Raamsdonk [et al.] // N Engl J Med. 2010. Vol.363. №23.- P. 2191-2199.
- 164. Van Raamsdonk C.D. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi / C.D. Van Raamsdonk [et al.] // Nature. 2009. Vol. 457. №7229. P. 599-602.
- 165. Van Raamsdonk C.D. Links between Schwann cells and melanocytes in development and disease / C.D. Van Raamsdonk, M. Deo // Pigment Cell Melanoma Res. 2013 Vol. 26. №5. P. 634-645.
- 166. Virgili G. EUROCARE Working Group. Incidence of uveal melanoma in Europe / G. Virgili [et al.] // Ophthalmology. 2007. Vol.114. № 12. P. 2309-2315.
- 167. Weber, A. Absence of mutations of the BRAF gene and constitutive activation of extracellular-regulated kinase in malignant melanomas of the uvea / A. Weber [et al.] // Lab Invest. 2003. Vol. 83. №12. P.1771-1776.

- 168. Wood, L.D. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers / L.D. Wood [et al.] // Science. 2007. Vol. 318. №5853. P.1108-1113.
- 169. Yang C. The miRNA expression profile of the uveal melanoma / C. Yang, W. Wei // Sci China Life Sci. 2011. Vol.54. №4. P. 351-358.
- 170. Ye H. Genomic assessments of the frequent loss of heterozygosity region on 8p21.3-p22 in head and neck squamous cell carcinoma / H. Ye [et al.] // Cancer Genet Cytogenet. 2007. Vol. 176. №2. P. 100-106.
- 171. Zeschnigk M. Methylation Analysis of Several Tumour Suppressor Genes Shows a Low Frequency of Methylation of *CDKN2A* and *RARB* in Uveal Melanomas / M. Zeschnigk [et al.] // Comp Funct Genomics. − 2003. Vol.4. №3. P. 329-336.
- 172. Zuidervaart W. Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS. / W. Zuidervaart [et al.] // Br J Cancer. − 2005. Vol. 92. №11. − P. 2032-2038.